

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

MICHEL HOOREMAN

1^{re} THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION BUTANÉDIOLIQUE

2^e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

soutenues le 22 Décembre 1948, devant la Commission d'Examen

MM. E. AUBEL, *Président*

C. FROMAGEOT, *Examineurs*

G. CHAMPETIER, »



FACULTÉ DES SCIENCES

Nom du Candidat: **HOOREMAN.**

Prénoms: **Michel, Charles.**

Date de la soutenance: 22 Décembre 1948.

Numéro d'ordre: 3112, Série A. 2241.

(Ces deux mentions seront complétées par le service du Secrétariat de la Faculté)

HOOREMAN (Michel-Charles).

— Contribution à l'Etude de la fermentation butanédiolique. —
Paris, C. D. U., 1948, In-4°, 100 pages.

(Thèse Sc. Phys. Paris, 1948, Sér. A. 2241, N° 3112).

HOOREMAN (Michel-Charles).

— Contribution à l'Etude de la fermentation butanédiolique. —
Paris, C. D. U., 1948, In-4°, 100 pages.

(Thèse Sc. Phys. Paris, 1948, Sér. A. 2241, N° 3112).

HOOREMAN (Michel-Charles).

— Contribution à l'Etude de la fermentation butanédiolique. —
Paris, C. D. U., 1948, In-4°, 100 pages.

(Thèse Sc. Phys. Paris, 1948, Sér. A. 2241, N° 3112).

HOOREMAN (Michel-Charles)

— Contribution à l'Etude de la fermentation butanédiolique. —
Paris, C. D. U., 1948, In-4°, 100 pages.

(Thèse Sc. Phys. Paris, 1948, Sér. A. 2241, N° 3112).

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen. M. J. CABANNES.

PROFESSEURS

L. BLARINGHEM	T	Botanique.	Jacques BOURCART	Géographie physique et Géologie dynamique.
G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	M ^{me} JOLIO-CURIE	T Physique générale et Radioactivité.
C. MAUGUIN	T	Minéralogie.	PLANTEFOL	T Botanique.
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions,	CABANNES	T Recherches physiques.
L. LUTAUD	T	Géographie physique et géologie dynamique.	GRASSÉ	T Zoologie (Évolution des êtres organisés).
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	PREVOST	Chimie organique.
Robert LÉVY	T	Physiologie comparée . . .	BOULIGAND	T Application de l'analyse à la géométrie
Henri VILLAT	T	Mécanique des fluides et applications.	CHAUDRON	T Chimie.
Ch. JACOB	T	Géologie.	WYART	Minéralogie.
P. PASCAL	T	Chimie générale.	TEISSIER	T Zoologie.
M. FRÉCHET	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	MANGENOI	T Biologie végétale.
M ^{me} RAMART-LUCAS	T	Chimie organique	P. AUGER	T Physique quantique et relativité.
H. BEGHIN	T	Mécanique physique et expérimentale.	MONNIER	Physiologie générale.
FOCH	T	Mécanique expérimentale des fluides.	PIVETEAU	Géologie
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.	ROCARD	T Physique.
De BROGLIE	T	Théories physiques.	H. CARTAN	Calcul différentiel.
JOB	T	Chimie générale	SCHAEFFER	T Physiologie des fonctions.
PERNANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	LAFFITTE	Chimie (P. C. B.).
VILLEY	T	Mécanique appliquée.	LERAY	Mécanique théorique des fluides
COMBES	T	Physiologie végétale.	FAVART	Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	COULOMB	T Physique du globe
PÈRES	T	Mécanique rationnelle.	M ^{lle} Cousin	Biologie animale (P.C.B.). .
HACKSPILL	T	Chimie minérale.	CHRÉTIEN	Analyse et mesures chimiques.
LAUGIER	T	Physiologie générale	DRACH	Evolution des êtres organisés.
TOUSSAINT	T	Technique Aéronautique	CHATELET	T Arithmétique et théorie des nombres.
M. CURIE	T	Physique (P. C. B.).	EPHRUSSI	T Génétique.
G. RIBAUD	T	Hautes températures.	WURMSER	T Biologie physico-chimique.
CHAZY	T	Mécanique analytique.	KASTLER	Physique.
H. GAULT	T	Chimie appliquée	BAUER	T Chimie - Physique.
CROZE	T	Physique théorique et physique céleste.	RIVIERRE	Géologie (P.C.B.)
DUPONT	T	Théories chimiques.	GAUTHERET	Biologie Végétale (P.C.B.)
LANQUINE	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	LUCAS	Physique
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	MAX MORAND	Physique
BARRABE	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	ARNULF	Optique appliquée.
VAVON	T	Analyse et mesures chimiques.	A. THOMAS	Zoologie.
G. DARMOIS	T	Mathématiques générales.	SOLEILLET	Physique
CHATTON	T	Biologie maritime	FORTE	Mécanique expérimentale des fluides.
AUBEL	T	Chimie biologique.	DANJON	T Astronomie.
			FROMAGEOT	Chimie Biologique
			LAPORTE	Physique générale et Radioactivité.

Secrétaire CH. MONIER

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DE LA

FERMENTATION BUTANEDIOLIQUE

A la mémoire de mon Père

A ma femme, à mes enfants

A tous les miens

A tous ceux qui me sont chers

A Monsieur le professeur M. Lemoigne

Chef du service des fermentations à l'Institut Pasteur

Membre de l'Académie d'Agriculture

qui inspira ces recherches
et suivit leur développement
avec une constante bienveillance
en témoignage de profonde gratitude

A Monsieur le professeur G. Charlot

Professeur à l'Ecole de Physique et Chimie Industrielles de Paris

dont l'enseignement si fécond,
m'a sans cesse guidé dans
la première partie de ce travail
en hommage très respectueux

A tous mes camarades de l'Institut Pasteur

à ceux qui par leur concours
désintéressé, leurs critiques
amicales, m'ont efficacement
aidé
en signe de cordial attachement

I N T R O D U C T I O N

Conformément à une suggestion de Lemoigne (42), on appelle fermentation butanediolique toute fermentation des glucides aboutissant à une production importante de 2-3 butanediol $\text{CH}_3\text{-CHOH-CHOH-CH}_3$ et d'acétoïne⁴⁾ $\text{CH}_3\text{-CHOH-CO-CH}_3$, composés accompagnés souvent par des traces de diacétyl $\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$. On a signalé successivement comme capables de provoquer une telle fermentation les microorganismes suivants :

- Microbes du genre aerobacter.

Grimbert (24), pour la première fois mit en évidence l'existence de l'acétoïne dans les milieux fermentés, en cultivant un microbe qu'il appelait bacillus tartricus, et qui fut identifié ensuite comme appartenant au genre aerobacter. Puis Harden et Walpole (26) montrèrent que aerobacter aerogenes (qu'ils appelaient bacillus lactis aerogenes) provoque en anaérobiose la formation de traces d'acétoïne et la production abondante de butanediol. Thomson (92) observa les mêmes faits avec aerobacter cloacae (qu'il appelait bacillus cloacae). Les fermentations provoquées par ces microbes ont été étudiées dernièrement en vue d'applications industrielles (65,72,87,99).

- Bacillus subtilis et certains microbes du même groupe.

Desmots (13) fut le premier à signaler la formation d'acétoïne par les microbes de ce groupe. Lemoigne (42) trouva ensuite le butanediol dans les cultures aérobies de b. subtilis, bien qu'alors il semblât peu probable qu'un composé aussi réduit pût se former en aérobie; Lemoigne créa à cette occasion l'expression de fermentation butanediolique. Neish et coll (2,60) ont fait récemment une étude systématique de la glycolyse déterminée par ces microbes tant en aérobie qu'en anaérobiose.

4)

Plutôt que les termes butylèneglycol et acétylméthylcarbinol, nous emploierons les termes butanediol et acétoïne, (5) aussi logique et aussi répandus, mais plus courts.

- Serratia marcescens, appelé autrefois bacillus prodigiosus.

Le fait que ce microbe provoque une fermentation butanediolique a été signalé initialement par Lemoigne (44), puis indépendamment par Pederson et Breed (69); des études récentes (61) ont précisé le comportement de différentes espèces microbiennes appartenant au genre serratia.

- Aerobacillus polymyxa.

Donker dans sa thèse de doctorat (18) a étudié les propriétés de ce microbe, et a montré en particulier qu'il donne lieu à une fermentation butanediolique. Stahly et Werkman (85) ont analysé certains aspects du mécanisme de cette fermentation, qui, par ailleurs, a suscité de nombreux travaux scientifiques ou technologiques, en raison de son intérêt industriel (1,36,37).

- Aeromonas hydrophila.

Ce microbe qu'on a appelé également Proteus hydrophilus a été étudiée par Stanier et Adams (86), mais n'a pas fait jusqu'ici l'objet de travaux aussi nombreux et étendus que les microbes précédents.

A côté de ces microorganismes provoquant une fermentation butanediolique proprement dite, il en est beaucoup d'autres qui produisent des quantités de butanediol et d'acétoïne plus faibles, mais susceptibles d'être caractérisées avec certitude. On sait d'ailleurs que la réaction de Voges-Proskauer (98) ou ses variantes (3,66), la réaction de Lemoigne (46), qui permettent précisément de caractériser l'acétoïne, sont souvent utilisées en bactériologie pour l'identification des espèces. Parmi les microorganismes produisant de petites quantités de butanediol ou d'acétoïne, nous signalerons en particulier :

- Divers anaérobies stricts (76) et notamment clostridium acetobutylicum (105,106).

- La plupart des levures (37,74)...

- Certains microbes du genre proteus (48), streptococcus (64), staphylococcus (43), vibrio (vibrion cholérique), corynebacterium (bacille diphtérique) (47), brucella (3)...

- Un grand nombre de microbes appartenant au genre bacillus (51), par exemple b. anthracis (bactéridie charbonneuse) (45), b. cereus (12).

Il s'ensuit qu'on trouve le butanediol, l'acétoïne et le diacétyl dans les produits alimentaires dont la fabrication fait appel à l'action des microorganismes : beurre (8,41), pain, vin, bière, jus de fruits (74), vinaigre...

En outre, le butanediol et l'acétoïne existent dans les feuilles des plantes vertes (57), dans les graines en germination (52), dans le sang (50,100) et l'urine (81,101) des mammifères.

De l'ensemble de ces données, nous concluons avec Lemoigne (51) qu' "on doit considérer la fermentation butanediolique comme un processus normal, très fréquent sinon absolument général du métabolisme glucidique".

Parmi les nombreux travaux récents consacrés à la fermentation butanediolique, on peut distinguer 2 groupes principaux.

Un premier groupe de travaux a pour but la production industrielle, à partir de l'amidon ou de la cellulose hydrolysés, du butanediol et de l'acétoïne. Ces composés se prêtent en effet à différents usages; ils constituent notamment des matières premières pour la fabrication de caoutchouc synthétique ou de résines polyvinyliques. Les recherches ont porté spécialement sur les fermentations provoquées par aerobacillus polymyxa (1,37), aerobacter aerogenes (65,72,87,99); elles ont conduit à des résultats pratiques intéressants. Toutefois la récupération du butanediol après fermentation des moûts n'est que difficilement réalisable, ce composé étant peu volatil; en outre d'abondants résidus solides demeurent en suspension dans les moûts fermentés et gênent les opérations. On parvient cependant à récupérer le butanediol en l'entraînant à la vapeur sous pression (5); on en l'extrayant à contre-courant par des solvants tels que le butanol, l'acétate de butyle (67); ou encore en le faisant réagir avec le méthanal : on obtient ainsi un acétal cyclique volatil qu'on sépare aisément, on régénère ensuite par hydrolyse le butanediol et le méthanal (82). Il est avantageux de faire précéder toutes ces opérations d'une clarification des moûts fermentés par filtration ou centrifugation (89).

Un deuxième groupe de travaux apporte des précisions sur le mécanisme de la formation d'acétoïne par divers organismes. Silverman et Werkman (83), Green et Coll. (22) ont montré que des extraits enzymatiques provenant, soit d'un microbe : aerobacter aerogenes, soit de tissus animaux variés : coeur, cerveau, rein de porc, muscles de lapin, de pigeon, de cheval, étaient capables de former de l'acétoïne aux dépens de l'acide pyruvique; l'ester pyrophosphorique de la vitamine (diphosphocœurine, diphosphothiamine, coocarboxylase) serait un co-facteur de cette réaction.

Ces travaux, confirmant la possibilité d'une formation d'acétoïne par les organismes supérieurs déjà établie préalablement.

P R E M I E R E P A R T I E

NOUVELLES METHODES POUR LE DOSAGE DES COMPOSES CARACTERISTIQUES DE LA FERMENTATION

Nous avons établi des méthodes nouvelles pour le dosage des composés caractéristiques de la fermentation, qui sont, nous l'avons vu :

Le 2-3 butanediol	$\text{CH}_3\text{-CHOH-CHOH-CH}_3$
L'acétolne	$\text{CH}_3\text{-CO-CHOH-CH}_3$
Le diacétyle	$\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$

Dans un chapitre initial, nous ferons d'abord un exposé critique des méthodes antérieurement proposées pour le dosage de ces composés; puis nous donnerons le principe de nos nouvelles méthodes d'après lesquelles le dosage du butanediol se ramène à un dosage d'acétolne, lequel se ramène à un dosage de diacétyle, lequel enfin se ramène à un dosage de diméthylglyoxime. A la suite de ce chapitre initial, nous aurons par conséquent 4 chapitres distincts, consacrés respectivement au microdosage de la diméthylglyoxime, du diacétyle, de l'acétolne et du butanediol.

Nos méthodes ont été spécialement établies pour l'étude des fermentations butanedioliques typiques. Mais elles sont aussi applicables, moyennant parfois certaines modifications, à l'étude de la plupart des nombreux milieux biologiques qui contiennent les composés caractéristiques de la fermentation, ainsi qu'à l'étude de certaines réactions de chimie organique au cours desquelles ces composés sont susceptibles d'être formés (11).

CHAPITRE I

FONDEMENT DE NOS NOUVELLES METHODES

1. EXPOSE CRITIQUE DES METHODES ANTERIEURES.

De nombreuses publications sont partiellement ou totalement consacrées au dosage du diacétyl, de l'acétoïne et du butanediol; dans cet exposé nous signalerons seulement les principales d'entre elles.

I. DOSAGE DU DIACETYLE.

A - Méthodes fondées sur la transformation du diacétyl en diméthylglyoxime.

Par action d'un excès d'hydroxylamine, le diacétyl est transformé en diméthylglyoxime (33,63) qui est dosée grâce aux combinaisons colorées qu'elle donne avec différents cations : Ni (II), Ni (IV), Fe (II), ou avec l'urée en milieu acide.

En présence de Ni (II), la diméthylglyoxime donne quantitativement en milieu faiblement alcalin de la diméthylglyoxime nickeleuse, précipité rose insoluble (97), utilisé pour la caractérisation et le dosage, soit du nickel, soit du diacétyl (63,80). Il s'agit là de dosages gravimétriques, spécifiques, précis, mais assez longs et peu sensibles. Par dissolution de la diméthylglyoxime nickeleuse dans le chloroforme (2), la pyridine (15), ces dosages gravimétriques du diacétyl deviennent des dosages colorimétriques; ils sont alors plus sensibles, mais aussi plus longs.

Avec Ni (IV), la diméthylglyoxime donne en milieu alcalin de la diméthylglyoxime nickelique, complexe rouge soluble (20), utilisé pour le dosage, soit du nickel, soit du diacétyl (88,91). Mais les techniques relatives à ce dernier cas sont longues et délicates.

Avec Fe (II) la diméthylglyoxime donne un milieu ammoniacal une coloration rose rouge, utilisée pour le dosage du diacétyl (77); il est nécessaire d'observer différentes précautions afin d'éviter la transformation partielle de Fe (II) en Fe (III).

Signalons enfin qu'on a utilisé récemment la coloration de

la combinaison donnée en milieu acide par la diméthylglyoxime et l'urée, pour établir une méthode de dosage du diacétyl à 10 % près (102).

B - Méthodes fondées sur des réactions colorées du diacétyl.

Pien et coll. (75) utilisent la coloration jaune d'une quinoxaline résultant de la condensation du diacétyl avec la diaminobenzidine. La méthode qu'ils proposent est intéressante, mais a l'inconvénient d'exiger l'emploi de chlorhydrate de diaminobenzidine, réactif spécial qu'on ne trouve que difficilement ou qu'il faut préparer soi-même. Par ailleurs, la coloration jaune formée est peut-être moins spécifique du diacétyl que le précipité rose de diméthylglyoxime nickelleuse utilisé dans certaines des méthodes déjà signalées.

Divers auteurs et notamment Westerfeld (100) ont proposé des méthodes fondées sur des variantes de la réaction de Voges-Proskauer (98). Cette réaction, qui a été étudiée (19,27) et améliorée (3,66) à différentes reprises, s'effectue en effet à partir du diacétyl ou de l'acétoïne. Les méthodes proposées, très sensibles, ont toutefois l'inconvénient d'utiliser des colorations peu stables qui ne correspondent pas à la formation d'un composé défini. En outre, ici encore et de l'avis même de Westerfeld, la coloration formée est probablement moins spécifique du diacétyl que le précipité rose de diméthylglyoxime nickelleuse.

C - Méthodes diverses.

D'autres méthodes, généralement moins avantageuses ou moins usuelles, ont encore été proposées. Nous signalerons en particulier une méthode polarographique (23).

II. DOSAGE DE L'ACETOÏNE.

A - Méthodes fondées sur l'oxydation de l'acétoïne en diacétyl.

Dans ces méthodes, le dosage de l'acétoïne se ramène à un dosage de diacétyl, aussi ces méthodes ont-elles entre autres, les caractéristiques et les inconvénients déjà signalés précédemment. Nous ne nous occuperons donc ici que de la façon dont on réalise l'oxydation de l'acétoïne en diacétyl.

Lemoigne (46) a indiqué que cette oxydation s'effectue convenablement par action du chlorure ferrique. En pratique, à la solution contenant l'acétoïne on ajoute un excès de chlorure ferrique,

et on distille lentement la moitié environ du volume total; Tout le diacétyle formé se retrouve dans le distillat où on le caractérise par formation de diméthylglyoxime nickeleuse. Plusieurs auteurs (16, 63, 84, 93, 106) ont cherché à transformer la méthode de caractérisation de Lenoigne en une méthode de dosage; de l'ensemble de leurs résultats il ressort que les rendements en diacétyle sont de 80 - 85 %.

Kniphorst et Kruisheer (39) ont proposé l'amélioration importante qui consiste à utiliser pour l'oxydation un mélange de chlorure ferrique et de sulfate ferreux au lieu de chlorure ferrique seul; dans ces conditions les rendements en diacétyle, plus élevés et plus constants, seraient de 96 %.

L'oxydation en diacétyle une fois réalisée, au lieu de doser gravimétriquement ce composé comme dans les méthodes précédentes, on peut le doser par colorimétrie (100, 102) ou par polarographie (23).

B - Méthodes diverses.

Nous avons vu que la réaction colorée de Voges-Proskauer (98) s'effectue à partir du diacétyle ou de l'acétoïne; cette réaction ou ses variantes (3, 66) sont donc utilisables pour le dosage de l'un ou l'autre de ces composés (100). Dans les deux cas, les inconvénients des méthodes proposées sont les mêmes; ils ont déjà été signalés ci-devant.

Langlykke et Peterson (41) ont établi une méthode fondée d'une part sur la réaction de Lieben ($R - CO - CH_3 + \frac{3}{2} I_2 + H_2O = R - COOH + CHI_3$), déjà proposée autrefois pour le dosage de l'acétoïne, et d'autre part sur le fait que l'acétoïne distille de ses solutions aqueuses à une vitesse constante indépendante de la concentration. Cette méthode, très simple, n'est que moyennement rapide et sensible; en outre sa spécificité est incertaine.

III. DOSAGE DU BUTANEDIOL.

A - Méthodes fondées sur l'oxydation du butanediol en diacétyle.

Dans ces méthodes le dosage du butanediol se ramène lui aussi au dosage déjà décrit du diacétyle, et nous n'aurons à nous occuper ici que de la façon dont on réalise l'oxydation en diacétyle.

Certains auteurs effectuent directement cette réaction par action du brome à la lumière (11, 28, 67), ou par action simultanée du brome et du chlorure ferrique (25, 37, 94), mais les rendements en diacétyle sont faibles et inconstants.

Matignon et Coll, (56), Kniphorst et Kruisheer (39), s'ins-

pirant du mode opératoire initial de Lemoigne (42), opèrent en 2 temps : d'abord ils oxydent le butanediol en acétoïne par action du brome à l'obscurité; ensuite ils réduisent le brome et oxydent l'acétoïne en diacétyl par le chlorure ferrique ou par un mélange chlorure-ferrique-sulfate ferreux. Les rendements en diacétyl seraient ainsi de 93 % d'après Kniphorst et Kruisheer. Ces méthodes ne sont guère applicables quand le butanediol est accompagné par des quantités importantes de composés organiques consommant du brome; en outre, il apparaît à l'usage que les rendements en diacétyl ne sont pas très constants.

B - Méthodes fondées sur l'oxydation periodique du butanediol en 2 molécules d'éthanal.

De nombreuses méthodes appartenant à cette catégorie ont été proposées récemment (9, 34, 55, 65, 71, 74). Elles ont l'inconvénient d'être fondées sur une réaction non spécifique du butanediol : un grand nombre de composés organiques (acétoïne, acide lactique, glycérol, sucres, etc...) donnent en effet par oxydation periodique des produits aldéhydiques variés. Il faut donc séparer ces composés du butanediol ou tenir compte de leur existence. Ceci est difficile à réaliser rigoureusement, et nécessite en tous cas la mise en oeuvre de diverses techniques qui rendent ces méthodes longues et peu sensibles.

2. PRINCIPE DE NOS NOUVELLES METHODES

Il semble qu'actuellement la plupart des auteurs aient renoncé à effectuer le dosage du butanediol par les méthodes de Matignon et Coll., Kniphorst et Kruisheer, et qu'ils aient préféré élaborer des méthodes fondées sur l'oxydation periodique du butanediol en éthanal : les nombreuses publications récentes que nous venons de signaler en font foi. Cependant ces dernières méthodes ont elles-mêmes les importants défauts précédemment indiqués, qui découlent du fait qu'elles reposent sur une réaction non-spécifique du butanediol.

Nous proposons au contraire, de revenir pour le dosage du diacétyl, de l'acétoïne et du butanediol, à des méthodes dérivant de celles de Matignon et Coll., Kniphorst et Kruisheer. Dans ces méthodes le dosage du butanediol est long, peu sensible, peu fidèle et pratiquement inexécutable dans le cas fréquent où le butanediol est accompagné par des quantités importantes de composés organiques consommant du brome. Néanmoins ces méthodes ont le grand intérêt d'être fondées sur des réactions qu'on peut considérer, en première analyse, comme spécifiques du butanediol et de l'acétoïne (tableau I). Aussi avons-nous pensé que ces méthodes étaient perfectibles. Nous en avons refait une étude détaillée, et avons pu mettre au point des méthodes nouvelles, dont nous allons donner brièvement les caractéristiques originales.

I. MICRODOSAGE DU DIACÉTYLE.-

Il était fondamental de posséder pour le dosage du diacétylène une méthode aussi satisfaisante que possible : le dosage de l'acétoïne et du butanediol se ramènent en effet à un dosage de diacétylène. Nous avons donc cherché à établir une méthode qui soit non seulement spécifique et précise comme les méthodes gravimétriques fondées sur la formation de diméthylglyoxime nickeleuse, mais qui soit également sensible et rapide. Or les méthodes colorimétriques sont généralement sensibles et rapides, et elles ont pu devenir précises depuis la mise en service des colorimètres modernes; c'est donc vers les méthodes colorimétriques que nous nous sommes tournés.

Encore fallait-il que la réaction colorée utilisée fût spécifique du diacétylène. A ce sujet nous devons d'abord préciser que, dans tous les cas, nous extrayons le diacétylène du milieu analysé par une distillation, ce qui élimine toute possibilité d'intervention des composés non volatils dans la réaction colorée. Cette réaction elle-même peut se faire, nous l'avons vu, soit après transformation du diacétylène en diméthylglyoxime, soit directement à partir du diacétylène; nous avons adopté la première de ces façons d'opérer, qui nous a paru présenter plus de garanties quant à la spécificité.

Microdosage de la diméthylglyoxime.-

Parmi les réactions colorées de la diméthylglyoxime, nous avons retenu celle qui correspond à la formation de diméthylglyoxime nickeliq, parce qu'elle présente une spécificité très grande. En effet, si on le désire, on peut réduire la diméthylglyoxime nickeliq en diméthylglyoxime nickeleuse; la formation de diméthylglyoxime nickeliq est donc tout aussi spécifique du diacétylène que la formation de diméthylglyoxime nickeleuse; or, depuis presque 30 ans, la formation de diméthylglyoxime nickeleuse a été souvent utilisée pour la recherche du diacétylène dans les milieux biologiques, et la spécificité de cette méthode, n'ayant encore jamais été contestée, doit être considérée comme tout-à-fait satisfaisante.

Mais les méthodes fondées sur la formation de diméthylglyoxime nickeliq sont longues et délicates; dans ces méthodes il faut en effet précipiter d'abord de faibles quantités de diméthylglyoxime nickeleuse puis les transformer en diméthylglyoxime nickeliq. Par contre, notre nouvelle méthode n'a plus les inconvénients précédents parce qu'elle est fondée sur la transformation directe et quantitative de la diméthylglyoxime en diméthylglyoxime nickeliq, sans précipitation intermédiaire de la diméthylglyoxime nickeleuse (31).

II. MICRODOSAGE DE L'ACÉTOÏNE.-

Un microdosage du diacétylène étant établi, le microdosage

CHAPITRE II

MICRODOSAGE DE LA DIMETHYLGLYOXIME

1.- PRINCIPE.

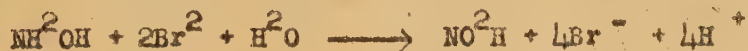
La méthode que nous proposons est fondée sur la formation de diméthylglyoxime nickelige, composé rouge soluble qui, d'après Feigl (20), est une combinaison de la diméthylglyoxime avec Ni (IV); les colorations formées sont mesurées à l'aide de l'électrophotomètre Meunier (58) construit par la maison Jobin-Yvon.

La diméthylglyoxime nickelige a déjà été utilisée, soit pour le dosage du nickel dans les aciers (59) ou dans divers organismes (68, 78), soit pour le dosage de la diméthylglyoxime formée par action de l'hydroxylamine sur le diacétyle (88, 91). Dans ces dernières méthodes, il faut d'abord précipiter intégralement des petites quantités de diméthylglyoxime nickeleuse, puis les transformer en diméthylglyoxime nickelige; aussi ces méthodes sont-elles longues et délicates.

Dans notre méthode au contraire, la diméthylglyoxime est transformée directement et quantitativement en diméthylglyoxime nickelige, sans précipitation intermédiaire de diméthylglyoxime nickeleuse. Pour réaliser une telle transformation à partir de solutions contenant de la diméthylglyoxime et un excès d'hydroxylamine, il faut :

a) éliminer l'excès d'hydroxylamine.

En effet l'hydroxylamine, qui est réductrice, empêcherait la formation de Ni (IV). Pour l'éliminer nous l'oxydons par l'eau de brome en un mélange de nitrites et nitrates, composés dont l'existence n'est plus incompatible avec celle de Ni (IV). Il est nécessaire que la solution ne devienne pas trop acide, sinon l'oxydation par l'eau de brome s'arrêterait; or une certaine acidité apparaît dans la solution du fait même de l'oxydation, comme le montre l'équation suivante qui traduit une des réactions principales subies par l'hydroxylamine :



Il faut donc tamponner la solution, et nous utilisons à cet effet l'acétate d'ammonium.

b) n'ajouter Ni (II) qu'après avoir éliminé l'hydroxylamine.

Après élimination de l'hydroxylamine par l'eau de brome, la

solution devient oxydante; si on ajoute des ions Ni (II), ils se transforment immédiatement en Ni (IV) et tout risque de précipitation partielle, irréversible, de diméthylglyoxime nickeleuse se trouve supprimé. Dans notre mode opératoire on ajoute Ni (II) alors que la solution est légèrement acide; il faut donc ajouter ensuite de l'ammoniaque, car la diméthylglyoxime nickelique se forme seulement en milieu alcalin, comme d'ailleurs la diméthylglyoxime nickeleuse.

c) ne pas détruire la diméthylglyoxime.

Nous avons constaté qu'un excès d'eau de brome détruit la diméthylglyoxime, et avons trouvé que l'utilisation de l'indicateur d'oxydo-réduction Iode/empois d'amidon (10) permet d'éviter cette destruction (31).

Cet indicateur vire de l'incolore au bleu pour un potentiel d'oxydo-réduction de 0,60 - 0,65 volt, et du bleu au jaune pâle pour un potentiel d'oxydo-réduction de 0,9 volt. Si à une solution contenant de la diméthylglyoxime, de l'hydroxylamine, de l'acétate d'ammonium et cet indicateur, on ajoute de l'eau de brome en s'arrêtant au moment du 2ème virage de l'indicateur, c'est-à-dire si l'on astreint le potentiel d'oxydo-réduction de la solution à ne jamais dépasser 0,9 volt, on constate que la diméthylglyoxime n'est aucunement détruite. Dans ces conditions, l'hydroxylamine est cependant oxydée en un mélange de nitrites et nitrates, et la solution devient suffisamment oxydante pour transformer Ni (II) en Ni (IV). Donc, si on lui ajoute encore Ni (II) et de l'ammoniaque, on obtient une formation quantitative de diméthylglyoxime nickelique; en outre, le milieu devenant alcalin, la coloration jaune pâle de l'indicateur disparaît totalement.

En arrêtant l'addition d'eau de brome quelques gouttes avant le 2ème virage de l'indicateur, on serait conduit à une formation simultanée de diméthylglyoxime nickeleuse et de diméthylglyoxime nickelique; en l'arrêtant quelques gouttes après, on serait conduit à une formation exclusive mais non quantitative de diméthylglyoxime nickelique.

2. MODE OPERATOIRE

I - REACTIFS (I)

A) Chlorhydrate d'hydroxylamine - Solution à 6% de ClH , NH^2OH dans l'eau distillée

(I) Par solution à x% d'un certain produit dans l'eau distillée, nous entendons une solution contenant xg. de ce produit pour 100 g. de solution (et non pour 100 g. d'eau distillée, ou pour 100 cm³ de solution).

B) Acétate d'ammonium - Solution à 60 % de $\text{CH}_3 - \text{CO}^2\text{NH}^4$ dans l'eau distillée.

C) Indicateur d'oxydo-réduction - Solution à 1,5 % d'amidon soluble, 0,3 % de IK et 20 % de ClK dans l'eau distillée (ClK, ajouté à forte dose, supprime l'éventualité d'un développement bactérien aux dépens de l'amidon).

D) Eau de brome - Solution à 6 % de BrK et 6 % de Br dans l'eau distillée.

E) Chlorure de nickel - Solution à 2 % de CL^2Ni , 6 H^2O dans l'eau distillée.

F) Ammoniaque - Solution à 25 % de NH^3 (environ 12 N).

II - MODE OPERATOIRE.

Dans une fiole de 20 cm³ placer 10 cm³ de solution contenant 120 à 600 de diméthylglyoxime, et 1 cm³ de A (c'est effectivement à un tel milieu qu'on sera ramené lors du dosage du diacétyle, de l'acétoïne ou du butanediol).

Ajouter 0,5 cm³ de B, 0,5 cm³ de C; puis à l'aide d'une burette D jusqu'à coloration bleue; à partir de ce moment, continuer l'addition de D goutte à goutte, en agitant entre chaque goutte : la coloration passe brusquement du bleu au jaune pale; ajouter 0,5 cm³ de E, 1 cm³ de F, agiter; compléter à 20 cm³ et colorimétrer (Nous utilisons dans ce but l'électrophotomètre Meunier avec l'écran bleu qui laisse passer les radiations ayant une longueur d'onde comprise entre 350 et 550 μg ; la courbe d'étalonnage de l'appareil est donné par la figure 1).

La précision des résultats est de 1 %.

3. JUSTIFICATION DU MODE OPERATOIRE.

Les expériences relatées dans ce paragraphe et le tracé de la courbe d'étalonnage (fig. 1) ont été faits à partir de diméthylglyoxime "Prolabo" purifiée par recristallisation dans l'alcool, ayant pour point de fusion 233° environ.

I - DOSAGE DE LA DIMETHYLGLYOXIME DANS UNE SOLUTION PURE.

La quantité prescrite de chlorhydrate d'hydroxylamine permet une transformation rapide du diacétyle en diméthylglyoxime; elle sera justifiée au chapitre suivant.

La quantité d'indicateur d'oxydo-réduction a été choisie de façon que le virage soit net. La quantité de chlorure de nickel est telle que le nickel existe toujours à une concentration au moins 15 fois

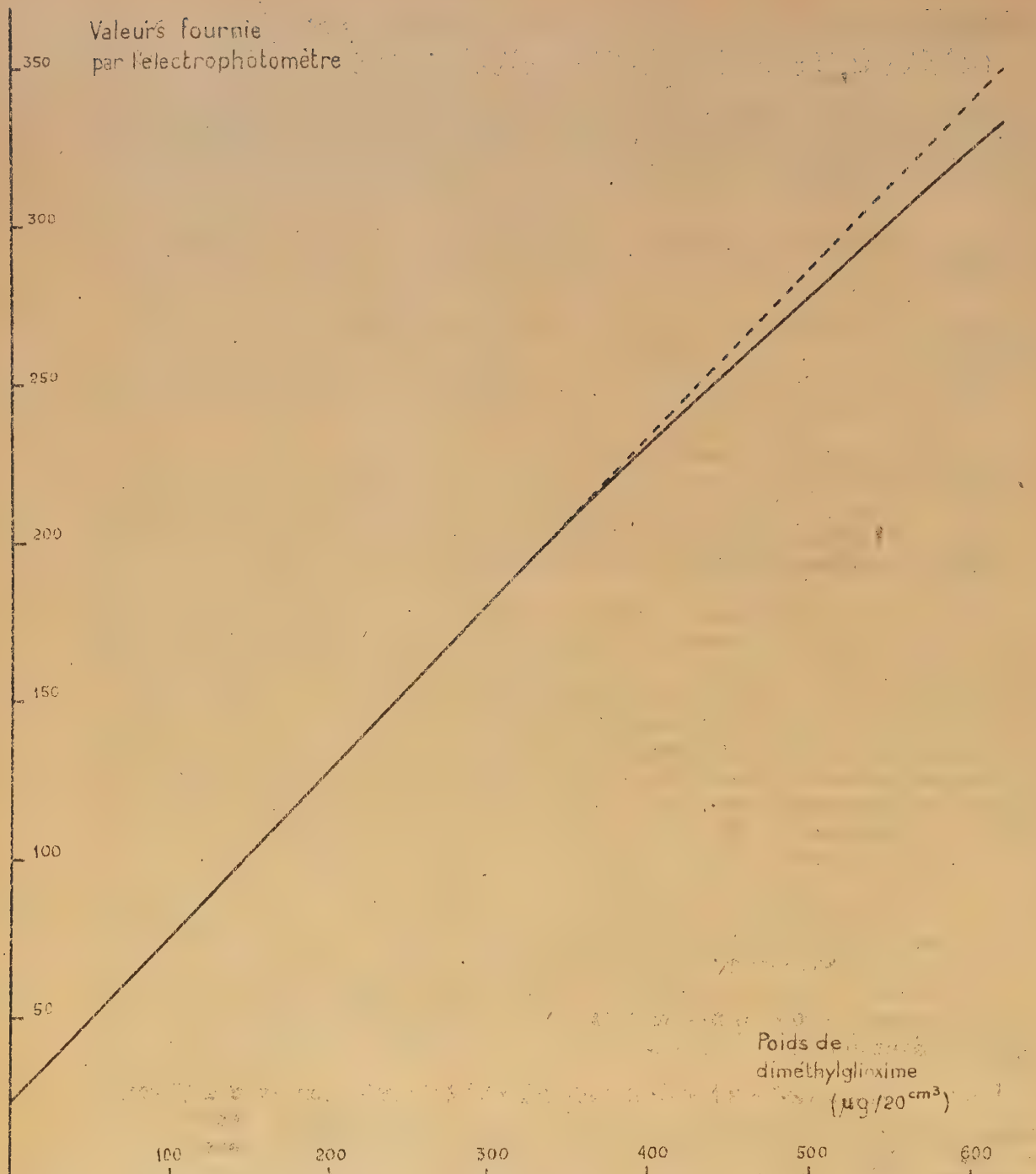


Fig. 1. - Courbe d'étalonnage de l'électrophotomètre

(les valeurs fournies par l'appareil sont proportionnelles aux densités optiques des solutions examinées; la valeur 100 correspond à une densité optique de 0,33).

supérieure à la concentration minimum théoriquement nécessaire.

La quantité d'ammoniaque peut sans inconvénients être modifiée de + 30 %; si elle est insuffisante, une coloration bleu-violacé due à l'indicateur se superpose à celle de la diméthylglyoxime nickeli- que, faussant ainsi les résultats.

La quantité d'eau de brome, à verser pour provoquer le 2ème virage de l'indicateur, dépend de la quantité d'acétate d'ammonium; en effet l'acétate d'ammonium, en tamponnant la solution, permet une oxydation plus complète de l'hydroxylamine, ce qui nécessite une quantité plus grande d'eau de brome. Le tableau II présente l'influence de la quantité d'acétate d'ammonium sur le pH de la solution au moment du 2ème virage, sur la quantité d'eau de brome, et sur les valeurs fournies par l'électrophotomètre. Lorsque la quantité d'acétate d'ammonium varie entre 0,35 et 1 cm³, le pH au moment du virage varie entre 1,4 et 4,1, la quantité d'eau de brome entre 2,9 et 4,65 (ce qui correspond à des variations des proportions de nitrites et nitrates formées par oxydation de l'hydroxylamine), et cependant les valeurs fournies par l'électrophotomètre (donc les quantités de diméthylglyoxime nickeli- que formées) demeurent les mêmes aux erreurs d'expériences près.

Pour différentes valeurs de la quantité d'acétate d'ammonium, il est intéressant de chercher comment varient les valeurs fournies par l'électrophotomètre quand on ajoute des quantités d'eau de brome inférieures, égales ou supérieures à celles qui provoquent le 2ème virage (tableau III). On constate en particulier que, dans les conditions de notre mode opératoire (0,5 cm³ d'acétate d'ammonium), on peut ajouter 0,15 cm³ d'eau de brome après le 2ème virage sans que varient ces valeurs; pour une addition, après ce virage, de quantités d'eau de brome égales ou supérieures à 0,2 cm³, on est conduit à des valeurs plus faibles, par suite d'une destruction partielle de la diméthylglyoxime.

Après addition du chlorure de nickel et de l'ammoniaque, la formation complète de diméthylglyoxime nickeli- que s'effectue en moins de 2 minutes. La stabilité des colorations est satisfaisante : à la température du laboratoire (18°) la diminution de la densité optique est inférieure à 0,5 % par heure; à 6° elle est nulle, toutefois à 30° elle atteint 2,5 %.

Quand on utilise l'électrophotomètre Meunier avec l'écran bleu, la courbe d'étalonnage (fig. 1) est rectiligne pour des quantités de diméthylglyoxime inférieures à 300 µg; elle s'infléchit ensuite légèrement.

II - DOSAGE DE LA DIMETHYLGLYOXIME DANS UNE SOLUTION COMPLEXE.

Lorsqu'on effectue un dosage de diacétyl, d'acétoïne ou de

TABLEAU II - Influence de la quantité d'acétate d'ammonium

sur le pH de la solution au moment du 2ème virage
sur la quantité d'eau de brome
et sur les valeurs fournies par l'électrophotomètre.

Quantités d'acétate d'ammonium (cm ³)	pH de la solution au moment du virage	Quantités (X) d'eau de brome (cm ³)	Valeurs fournies par l'électrophotomètre
0,35	4,4	2,9	178
0,5	2,6	3,2	180
0,75	3,7	4,35	181
1	4,1	4,65	181

(X) l'eau de brome utilisée (réactif D) est environ 0,8 N
Expériences faites sur des prises d'essai contenant 301 μ g de diméthylglyoxime.

TABLEAU III - Valeurs fournies par l'électrophotomètre

pour différentes valeurs de la quantité d'acétate d'ammonium et pour des quantités d'eau de brome inférieures, égales ou supérieures à celles qui provoquent le 2ème virage.

Quantités d'acétate d'ammonium (cm ³)	Quantités d'eau de brome (cm ³) (la quantité d'eau de brome provoquant le 2ème virage étant prise comme origine)				
	- 0,15	0	+ 0,15	+ 0,30	+ 0,45
0,35	Formation de diméthylglyoxime nickelée	178	52		
0,5	id.	180	178	45	
0,75	id.	181	178	174	58
1	id.	181	177	175	115

Expériences faites sur des prises d'essai contenant 301 μ g de diméthylglyoxime.

butanediol dans les milieux biologiques, la diméthylglyoxime finalement formée peut être accompagnée par des quantités variables de composés volatils, ou par les combinaisons de ceux-ci avec l'hydroxylamine. Trois cas principaux sont à considérer.

A - Milieux spécialement pauvres en diacétyle, acétoïne, butanediol.

Comme exemple de ces milieux, nous citerons le sang, l'urine, les milieux fermentés par *bactérium coli*, etc.... qui ordinairement contiennent moins de 10 à 20 mg/l. des composés ci-dessus. Il s'agit là de cas particuliers se situant à la limite du domaine de validité de nos méthodes, et devant faire chacun l'objet d'une étude spéciale. Dans ces cas en effet, la diméthylglyoxime se trouve accompagnée par des quantités notables de composés divers qui parfois faussent les résultats, soit en provoquant la réduction progressive de la diméthylglyoxime nickeliée en diméthylglyoxime nickeleuse, soit en donnant naissance à des colorations généralement jaunes et peu intenses.

D'ailleurs, ainsi que nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent, il est toujours possible de s'assurer si une coloration incertaine est due, au moins partiellement, à de la diméthylglyoxime nickeliée, et par suite s'il y avait du diacétyle dans la prise d'essai. Pour cela, il suffit de réduire la solution obtenue, à l'aide de $O,1m^3$ du réactif A par exemple; la diméthylglyoxime nickeliée éventuellement présente se transforme en diméthylglyoxime nickeleuse, et on observe une décoloration immédiate suivie de l'apparition progressive du précipité rose caractéristique. Pour $600\mu g$ de diméthylglyoxime le précipité rose apparaît en quelques secondes; pour $120\mu g$ de diméthylglyoxime, il apparaît en quelques heures (il est commode de filtrer sur papier blanc pour le mettre en évidence). Pour des quantités de diméthylglyoxime inférieures à $120\mu g$, après addition du réactif A il faut, pour qu'apparaisse le précipité rose, concentrer la solution à petit volume dans une capsule de porcelaine blanche, puis porter la capsule au frigidaire pendant 24 h.; ainsi, on caractérise nettement des quantités de diméthylglyoxime supérieures à $60\mu g$.

B - Milieux contenant des homologues du diacétyle, ou donnant naissance à des composés.

Par application de nos méthodes à ces milieux, on provoque la formation d'homologues de la diméthylglyoxime, qui donnent des colorations intenses avec Ni (IV) comme la diméthylglyoxime elle-même, et qui par conséquent faussent les résultats.

En fait le méthylglyoxal est, vraisemblablement, le seul homologue du diacétyle qu'on peut obtenir à partir des milieux biologiques, exceptionnellement d'ailleurs; nous avons donc étudié le comportement de ce seul composé. Nous avons constaté que dans les conditions où nous effectuons le dosage du diacétyle, 10 mg. de méthylglyoxal donnent une

coloration rouge très intense, semblable à celle de la diméthylglyoxime nickelique, mais que par réduction à l'aide du réactif A, cette coloration vire au jaune sans qu'il se forme un précipité; ceci permet d'éviter toute confusion entre le méthylglyoxal et la diacétyle.

C - Milieus ayant subi une fermentation butanediolique typique.

En raison de la sensibilité de nos méthodes, ces milieux doivent être dilués dans une proportion généralement considérable avant d'être analysés; la diméthylglyoxime n'est alors accompagnée que par des quantités infimes d'autres composés, et aucune difficulté ne se présente.

4. FORMATION QUANTITATIVE DE DIMETHYLGLYOXIME NICKELIQUE

Il est impossible de séparer et de peser la diméthylglyoxime nickelique, trop soluble et instable, et par conséquent de prouver directement que, dans les conditions de notre mode opératoire, la formation de ce composé est quantitative. Nous croyons cependant être en mesure de l'affirmer. En effet :

d'une part le tableau II montre que, pour une même concentration en diméthylglyoxime, et pour des conditions opératoires très différentes (quantité d'acétate d'ammonium variant entre 0,35 et 1 cm³, et par suite pH au moment du 2ème virage variant entre 1,4 et 4,1, quantité d'eau de brome variant entre 2,9 et 4,1 cm³), la formation de diméthylglyoxime nickelique a toujours lieu avec le même rendement.

d'autre part, la courbe d'étalonnage de l'électrophotomètre (fig. 1) est très voisine d'une droite. Ceci suppose que, quelle que soit la concentration en diméthylglyoxime, la formation de diméthylglyoxime nickelique a lieu également avec ce même rendement.

L'existence d'un rendement privilégié est ainsi mise en évidence, et 2 interprétations se présentent :

ou bien ce rendement est différent de 100 %. On doit alors expliquer pourquoi il demeure constant quand les conditions opératoires varient dans une si large mesure; a priori nous ne voyons pas quelle serait cette explication.

ou bien ce rendement est égal à 100 %. L'explication du fait qu'il soit constant est alors évidente : la quantité de diméthylglyoxime de la prise d'essai est le seul facteur limitant la formation de diméthylglyoxime nickelique.

Il paraît donc logique d'admettre, jusqu'à plus ample infor-

mation, que ce rendement est bien égal à 100 %.

Si pour la diméthylglyoxime nickélique on accepte la formule brute de Feigl (20), suivant laquelle un atome de nickel est associé à deux molécules de diméthylglyoxime, on conçoit qu'un autre argument en faveur du caractère quantitatif de la formation de diméthylglyoxime nickélique puisse résulter de la comparaison entre la courbe d'étalonnage I (fig. 1), obtenue à partir de quantités limitées de diméthylglyoxime et d'un excès de Ni (IV), et une courbe analogue II obtenue à partir de quantités limitées de Ni (IV) et d'un excès de diméthylglyoxime. Mais cette comparaison est impossible car l'expérience montre que les composés correspondant aux courbes I et II ne sont pas les mêmes; ces composés diffèrent par leur coloration, voisines mais nettement distinctes (rouge orangé et rouge violacé), par leur stabilité à la chaleur et à l'action des réducteurs.

Nous nous proposons de revenir sur cette question dans une publication ultérieure.

~::~::~~

CHAPITRE III

MICRODOSAGE DU DIACÉTYLE

1.- PRINCIPE.-

Dans l'étude des fermentations butanedioliques typiques à l'aide des méthodes analytiques que nous proposons, il faut doser soit le diacétyle lui-même soit, le plus souvent, le diacétyle résultant de l'oxydation de l'acétoïne ou du butanediol. Dans tous les cas le diacétyle est extrait par distillation, puis transformé en diméthylglyoxime, laquelle est dosée comme nous venons de le voir. Nous n'avons donc à étudier ici que la distillation, et la transformation du diacétyle en diméthylglyoxime.

Pour éviter une retenue partielle du diacétyle, l'appareil utilisé pour la distillation ne doit comporter aucun bouchon de liège ou de caoutchouc (77). Cet appareil doit encore être aussi simple et de dimensions aussi réduites que possible, ainsi qu'il convient pour un appareil de microanalyse.

Plusieurs auteurs (63, 77, 80) ont indiqué que la transformation du diacétyle en diméthylglyoxime, sous l'influence d'un excès d'hydroxylamine, doit se faire par chauffage au bain-marie pendant 1 heure; dans notre mode opératoire, pour des quantités de diacétyle comprises entre 90 et 450 μ g; cette transformation demande seulement 15 minutes.

2.- MODE OPERATOIRE

I - APPAREIL & REACTIFS.-

L'appareil que nous utilisons pour la distillation du diacétyle (fig. 2) se compose :

a) d'un ballon de 100 ou 250 cm³ dont le col est constitué par le raccord extérieur d'un tube de jonction rodé normalisé, ayant pour grand diamètre 24 mm.

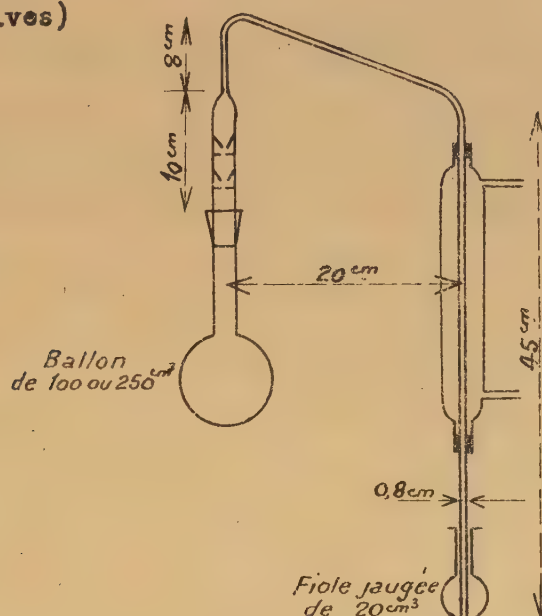
b) d'une colonne à distiller sommaire faite en creusant 2

étages de pointes de Vigreux dans le raccord intérieur du tube de jonction, et prolongée par un tube de faible diamètre 2 fois coudé, s'engageant par sa partie verticale dans un réfrigérant à eau.

Les réactifs sont les mêmes que pour le dosage de la diméthylglyoxime (cf. p. 14).

Fig. 2 - Appareil utilisé
pour la distillation

(dimensions approximatives)



II - MODE OPERATOIRE.

Dans le ballon de 100 cm³, placer 20, 30 ou 50 cm³ de solution contenant 90 à 450 μ g de diacétyle (ou dans le ballon de 250 cm³, placer 50, 100 cm³ de solution contenant le même poids de diacétyle); ajouter quelques grains de pierre ponce. Associer le ballon et la colonne à distiller; engager l'extrémité du tube réfrigérant dans une fiole de 20 cm³ contenant 1 cm³ du réactif A (chlorhydrate d'hydroxylamine à 6 %), en faisant plonger la pointe du tube dans le réactif. Chauffer jusqu'à l'ébullition, puis modérer le chauffage de façon à distiller

8 à 10 cm³ en 5 min. environ. On recueille ainsi dans la fiole tout le diacétyl initialement contenu dans le ballon.

Porter la fiole, qu'il est inutile de boucher, pendant 15 min. dans un bain-marie maintenu à une température égale ou supérieure à 80°. Le diacétyl est alors transformé en diméthylglyoxime avec un rendement de 97 + 1 %. Refroidir complètement la fiole sous courant d'eau et doser la diméthylglyoxime (cf. chapitre II).

Pour avoir à 1 % près le poids de diacétyl dans la prise d'essai, multiplier le poids de diméthylglyoxime par

$$\frac{86}{116} \times \frac{1}{97} = 0,764.$$

3. - JUSTIFICATION DU MODE OPERATOIRE.

Les expériences relatées dans ce paragraphe ont été faites à partir de diacétyl chimiquement pur (X), ayant pour point d'ébullition 89°. Nous verrons d'abord ce qui concerne la transformation du diacétyl en diméthylglyoxime, puis ce qui concerne la distillation du diacétyl.

A - Transformation du diacétyl en diméthylglyoxime.

La quantité de chlorhydrate d'hydroxylamine peut sans inconvénient être modifiée de + 20 %.

Entre pH3 et pH5 la vitesse de formation de la diméthylglyoxime demeure constante; pour pH6 elle diminue légèrement. Une élévation du pH du milieu par addition d'acétate de sodium, bien que prescrite par certains auteurs (77), ne s'impose donc pas.

Nous avons étudié les rendements en diméthylglyoxime en fonction du temps, et pour différentes températures du milieu réactionnel : le tableau IV résume nos résultats. On voit que les fioles peuvent indifféremment être chauffées à 80° ou à 90°, et que la durée du chauffage peut sans inconvénient être prolongée au-delà de 15 min. On remarque que pour les fioles chauffées au bain-marie le rendement en diméthylglyoxime ne dépasse jamais 97 %, mais qu'il finit par atteindre 99,6 % pour les fioles abandonnées à la température ordinaire (18°).

(X) C'est par l'intermédiaire de Monsieur le Professeur Kluyver, auprès de la firme hollandaise N.V. Nederlandsche Gist en Spiritus fabriek que nous avons obtenu le diacétyl, l'acétoïne et le butanediol utilisés dans nos expériences; nous tenons à leur exprimer ici nos sincères remerciements.

TABLEAU IV -

RENDEMENTS EN DIMETHYLGLYOXIME (%)

en fonction du temps
et pour différentes températures du milieu réactionnel.

Température du milieu réactionnel	Durée de la réaction (min.)					
	5	10	15	20	40	48 heures
fioles chauffées { 90°	90	97	97,4	97		
au bain-marie { 80°	78	96	97	96,6	96,8	
18°		8,5		19,5	43	99,6

TABLEAU V -

RENDEMENTS EN DIMETHYLGLYOXIME

pour des quantités variables de diacétyle

Poids de diacétyle dans la fiole (µg)	Valeurs fournies par l'électrophotomètre	Poids de diméthylglyoxime µg		Rendements (%)
		trouvé	calculé	
0	24	0	0	
85,5	81	111	115,5	96,1
171	141	226	231	97,8
256,5	199	339	346,5	97,7
342	248	445	462	96,3
427,5	297	554	577,5	96

Avant le dosage de la diméthylglyoxime la fiole doit être refroidie sous courant d'eau, de façon que la température du liquide n'excède pas 35°; sinon le résultat du dosage serait sujet à des erreurs par défaut assez importantes.

Le tableau V montre que, pour des quantités de diacétyl allant de 85,5 à 127,5 μg , les rendements en diméthylglyoxime sont de 97 $\pm$ 1%.

B - Distillation du diacétyl

Quand on distille 30 (ou 100) cm³ d'une solution contenant 4000 de diacétyl en utilisant le ballon de 100 (ou 250) cm³, tout le diacétyl se concentre dans les 4 (ou 8) premiers cm³ de distillat; le temps mis pour effectuer la distillation n'influe pas sur les résultats.

Ainsi, avec le ballon de 100 cm³, on pourrait recueillir seulement 4 à 5 cm³ de distillat, et utiliser par conséquent des fioles de 10 cm³ au lieu de 20 cm³, les quantités de réactifs étant toutes alors divisées par 2. On pourrait donc doser 45 à 225 μg de diacétyl ou d'acétoïne au lieu de 90 à 450, et 50 à 250 μg de butanediol au lieu de 100 à 500. Cette façon de procéder, avantageuse pour l'étude de certains milieux dilués, ne présente pas d'intérêt spécial pour l'étude des autres milieux.

La prise d'essai ne doit pas contenir plus de 10 mg, d'acétoïne, sinon une quantité notable d'acétoïne se retrouve dans la fiole de 20 cm³ et tend à provoquer la réduction de la diméthylglyoxime nickelleuse en diméthylglyoxime nickeleuse, lors du dosage final de la diméthylglyoxime. Le dosage du diacétyl en présence de quantités importantes d'acétoïne nécessite donc une mise au point particulière. D'ailleurs, le plus souvent, il faut doser, non le diacétyl lui-même, mais le diacétyl formé intermédiairement au cours d'un dosage d'acétoïne ou de butanediol, et dans ces conditions la prise d'essai ne contient évidemment pas d'acétoïne.

CHAPITRE IV

MICRODOSAGE DE L'ACÉTOÏNE

1.- PRINCIPE

Dans la méthode que nous proposons, le premier stade consiste en une oxydation de l'acétoïne en diacétyl; on se trouve ainsi ramené au dosage déjà décrit du diacétyl (cf. chapitre II et III). Nous n'avons donc à étudier ici que l'oxydation de l'acétoïne.

Conformément aux prescriptions de Lemoigne (19) on a d'abord effectué cette oxydation par action du chlorure ferrique; les rendements en diacétyl sont de 80 - 85 % (16, 63, 84, 93, 106). Kniphorst et Kruisheer (39), opérant sur 30 à 50 mg. d'acétoïne, ont ensuite montré que les rendements en diacétyl sont plus élevés et plus constants si on fait usage d'un mélange chlorure ferrique-sulfate ferreux, au lieu de chlorure ferrique seul, et ceci a été confirmé par Westerfeld notamment (100).

Utilisant donc le rôle favorable joué par le sulfate ferreux, nous avons mis au point le mode opératoire suivant, étudié pour des quantités d'acétoïne comprises entre 90 et 450 μ g.

2.- MODE OPERATOIRE

I - APPAREIL & REACTIFS.-

les mêmes que pour le dosage de la diméthylglyoxime et du diacétyl (cf. p. 14 et 22); en outre :

- A') Acide sulfurique - Solution à 15 % de $\text{SO}_4^{\text{H}^2}$ dans l'eau distillée.
- B') Chlorure ferrique - Solution à 50 % de Cl_3^{Fe} dans l'eau distillée (d = 1,49).
- C') Sulfate ferreux - Solution à 30 % de SO_4^{Fe} , 7 H_2O dans l'eau distillée.

Avant dosage, le col du ballon et la colonne à distiller de l'appareil utilisé (fig. 2, p. 23) doivent, s'il y a lieu, être débarrassés de tous dépôts de chlorure ferrique qui auraient pu s'y fixer au cours d'un dosage antérieur.

II - MODE OPERATOIRE.-

Dans le ballon de 100 cm^3 (fig. 2, p. 23), placer 20 cm^3 de solution contenant 90 à 450 μ g d'acétoïne, 1 cm^3 de A', 4 cm^3 de B' et 5 cm^3 de C' (ou dans le ballon de 250 cm^3 , placer 100 cm^3 de solution

contenant également 90 à 450 μg d'acétoïne, 5 cm³ de A', 20 cm³ de B' et 25 cm³ de C'); ajouter quelques grains de pierre ponce. Associer le ballon et la colonne à distiller; engager l'extrémité du tube réfrigérant dans une fiole de 20 cm³ contenant 1 cm³ du réactif A (chlorhydrate d'hydroxylamine à 6 %), en faisant plonger la pointe de ce tube dans le réactif.

Chauffer jusqu'à l'ébullition que pendant 20 min. on maintiendra très douce, de façon que les vapeurs formées se condensent seulement dans la colonne à distiller et non dans le réfrigérant descendant (pour réaliser cette condition il est commode de chauffer à feu nu avec un bec muni d'une veilleuse, et de laisser brûler seulement la veilleuse dès que le liquide entre en ébullition). Distiller ensuite 8 à 10 cm³ en 5 min. environ. On recueille ainsi dans la fiole tout le diacétyle formé à partir de l'acétoïne, et on est ramené à un dosage de diacétyle (cf. chapitres II et III).

L'acétoïne est finalement transformée en diméthylglyoxime avec un rendement de $Q_4 + 1\%$; pour avoir à 1 % près le poids d'acétoïne dans la prise d'essai, multiplier le poids de diméthylglyoxime par $\frac{88}{116} \times \frac{1}{Q_4} = 0,807$.

3.- JUSTIFICATION DU MODE OPERATOIRE

Les expériences relatées dans ce paragraphe ont été faites à partir de l'acétoïne cristallisée fournie par une firme hollandaise (cf. p. 24); ce produit, purifié par recristallisation dans l'acétone et séchage dans le vide sur chlorure de calcium, avait un point de fusion mal défini, égal à 100° environ, ce qui est conforme aux données de la littérature (41).

I - DOSAGE DE L'ACETOÏNE DANS UNE SOLUTION PURE.-

La quantité d'acide sulfurique peut sans inconvénients varier entre 0 et 2 cm³, quand on opère sur une solution pure d'acétoïne. L'addition d'acide sulfurique ne s'impose donc pas dans ce cas, mais elle devient nécessaire quand on effectue un dosage d'acétoïne dans certains milieux fermentés, tamponnés aux environs de pH7.

Les quantités de chlorure ferrique et de sulfate ferreux peuvent être modifiées de + 20 %; un essai fait sans sulfate ferreux (cas des méthodes antérieures à celles de Knipphorst et Kruisheer) nous a conduit à un rendement de 83,5 % au lieu de Q_4 %.

Avec le ballon de 100 cm³, au lieu d'opérer sur 20 cm³ d'une

solution d'acétoïne, on peut opérer sur 10 ou 30 cm³, sans changer la quantité des réactifs.

Si l'on maintient l'ébullition douce pendant 15 min. seulement, la transformation de l'acétoïne en diacétyle est incomplète, et le rendement final en diméthylglyoxime n'est que de 90 %; si on la maintient pendant 20 min. ou davantage, ce rendement devient ou demeure égal à 94 %. Le col du ballon et la colonne à distiller ne doivent pas être souillés par des dépôts de chlorure ferrique provenant de dosages antérieurs, sinon le diacétyle, qui pendant l'ébullition douce se condense dans ces régions de l'appareil, serait partiellement détruit.

Le tableau VI montre que, pour des quantités d'acétoïne allant de 98 à 394 μ g, les rendements en diméthylglyoxime sont de 94 $\pm$ 1 %.

TABEAU VI

RENDEMENTS EN DIMETHYLGLYOXIME

pour des quantités variables d'acétoïne

Poids d'acétoïne dans la prise d'essai (μ g)	Valeurs fournies par l'électrophotomètre	Poids de diméthylglyoxime (μ g)		Rendements (%)
		trouvé	calculé	
0	24	0	0	
98,5	87	122	130	93,9
197	152	247	260	95
295,5	211	365	390	93,6
394	267	486	520	93,5
394	270	492	520	94,6

II - DOSAGE DE L'ACETOINE DANS UNE SOLUTION COMPLEXE.-

La prise d'essai peut sans inconvénient contenir des quantités importantes de composés non volatils, par exemple 500 mg. de glucose ou de glycérol. Westerfeld (100) a fait remarquer que 9 mg. de glucose mis en solution dans de l'acide sulfurique 4 N et portés au bain-marie bouillant pendant 2 heures, fournissent 8,3 μ g, de diacétyle; mais dans les conditions très différentes de notre mode opératoire, il ne saurait

y avoir formation d'une quantité appréciable de diacétyl aux dépens du glucose.

La quantité d'éthanol de la prise d'essai ne doit pas dépasser 200 mg.; l'éthanol gêne en effet lors du dosage final de la diméthylglyoxime quand il existe en grandes quantités. Notre mode opératoire ne peut donc s'appliquer directement au cas du dosage de l'acétoïne dans les vins, qui contiennent, par litre, environ 100 g. d'éthanol et, au plus, 20 mg. d'acétoïne seulement (74). On peut cependant estimer rapidement la concentration des vins en acétoïne en opérant de la façon suivante : Placer 20 cm³ de vin dans le ballon de 250 cm³ (fig. 2 p. 23); ajouter 90 cm³ d'eau et distiller lentement 10 cm³ : la plus grande partie de l'éthanol et 25 % environ de l'acétoïne passent dans le distillat. Après refroidissement, ajouter à la solution demeurant dans le ballon 5 cm³ de A', 20 cm³ de B', 25 cm³ de C', et continuer le dosage de l'acétoïne suivant le mode opératoire ci-devant. L'acétoïne contenue dans les 20 cm³ de vin est finalement transformée en diméthylglyoxime avec un rendement voisin de 70 %; pour en avoir le poids, à environ 5 % près, multiplier le poids de diméthylglyoxime par

$$\frac{88}{116} \times \frac{1}{70} = 1,08.$$

D'après une remarque intéressante, de Westerfeld également (100), des composés tels que l'urée, l'acide urique, l'allantoïne, en se combinant avec le diacétyl naissant, faussent le dosage de l'acétoïne. Dans les milieux contenant de tels composés (sang, urine), le dosage de l'acétoïne doit donc faire l'objet d'une mise au point spéciale que nous n'étudierons pas ici.

En raison de la sensibilité de nos méthodes, les milieux ayant subi une fermentation butanediclique typique doivent être dilués dans une proportion généralement considérable avant d'être analysés, et le dosage de l'acétoïne dans ces milieux dilués ne présente plus aucune difficulté.

CHAPITRE V

MICRODOSAGE DU 2 - 3 BUTANEDIOL

1.- PRINCIPE.

Dans la méthode que nous proposons, on commence par faire subir au butanediol une oxydation en diacétyle; on se trouve ainsi ramené au dosage déjà décrit du diacétyle (cf. chapitres II et III). C'est donc seulement l'oxydation du butanediol que nous avons à étudier ici.

On a montré que cette oxydation peut s'effectuer, soit par action du brome à la lumière (11, 28, 69), soit par action simultanée du brome et du chlorure ferrique (25, 37, 94), mais les rendements en diacétyle sont faibles et inconstants. Ces mauvais rendements ne semblent dus ni à une destruction directe du butanediol ou de l'acétoïne qui se forme intermédiairement, ni à une oxydation incomplète de ces composés; ils semblent dus simplement à une destruction partielle par le brome du diacétyle formé. Guidés par cette interprétation, nous avons fait divers essais dans le but d'améliorer ces rendements. D'une part, nous avons étudié l'action, en présence de catalyseurs variés (sels d'aluminium, de fer, de nickel), de certains oxydants ayant un potentiel d'oxydo-réduction légèrement inférieur à celui du brome (iodate, hypobromite, chlorure d'iode, utilisés en milieu faiblement acide); a priori de tels oxydants étaient en effet susceptibles d'oxyder le butanediol en diacétyle sans aller jusqu'à détruire ce dernier composé. D'autre part, utilisant la différence de volatilité entre le diacétyle ($E = 89^\circ$) et le butanediol ($E = 178^\circ$) nous avons essayé, par distillation fractionnée, de soustraire dès sa formation le diacétyle du milieu oxydant, sans entraîner le butanediol. Tous ces essais ont échoué.

Consultant en détail la littérature, nous avons alors trouvé les résultats de Matignon et Coll. (56), Kniphorst et Kruisheer (39). La connaissance de ces résultats, leur comparaison avec ceux obtenus par d'autres auteurs (25, 42, 94) et par nous-mêmes, permettent de dégager les conclusions suivantes :

- a) les mauvais rendements qu'on obtient quand on transforme

directement le butanediol en diacétyle, soit par action du brome à la lumière, soit par action simultanée du brome et du chlorure ferrique, sont dus, principalement, à une destruction par le brome du diacétyle formé.

b) le brome à la lumière réalise l'oxydation du butanediol en acétoïne et celle de l'acétoïne en diacétyle; à l'obscurité la vitesse de la seconde de ces réactions, et de celle là seulement, est fortement diminuée. Ce dernier fait est d'autant plus remarquable que l'acétoïne est généralement plus oxydable que le butanediol puisqu'elle est déjà touchée par des oxydants doux, tels que le chlorure ferrique, qui sont sans action sur le butanediol.

Par conséquent il faut, comme Matignon et Coll., Kniphorst et Kruisheer, opérer en 2 temps : d'abord, par le brome à l'obscurité, oxyder le butanediol en acétoïne; ensuite réduire le brome et oxyder l'acétoïne en diacétyle par le chlorure ferrique, ou mieux par un mélange chlorure ferrique-sulfate ferreux. Ainsi le brome n'étant jamais en contact avec le diacétyle ne peut détruire ce composé.

Mais les méthodes proposées par Matignon et Coll., Kniphorst et Kruisheer sont longues, peu sensibles, peu fidèles et inapplicables dans le cas fréquent où le butanediol est accompagné par des quantités importantes de composés organiques consommant du brome. Utilisant les mêmes principes que ces auteurs, mais effectuant le dosage du diacétyle par notre propre méthode, nous avons pu supprimer les inconvénients précédents. En particulier la méthode que nous avons établie demeure valable quand le butanediol est accompagné par des quantités importantes de composés organiques. Nous effectuons en effet le dosage du butanediol sur des quantités environ 100 fois moins grandes que celles prescrites par Kniphorst et Kruisheer, et les quantités de composés organiques dans la prise d'essai s'en trouvent d'autant diminuées. La consommation de brome due à ces composés est alors généralement faible, aussi devient-il aisé de la déterminer et de la compenser (32).

2.- MODE OPERATOIRE.

I - APPAREIL & REACTIFS.

Les mêmes que pour le dosage de la diméthylglyoxime, du diacétyle et de l'acétoïne (cf. p. 14, 22 et 27); en outre :

Eau de brome 0,4 N - Solution saturée de brome dans l'eau distillée.

Cette solution, environ 0,4 N, garde son titre indéfiniment si elle est conservée sur un excès de brome liquide (qui compense les inévitables pertes de brome par évaporation survenant lors de la manipulation de la solution).

II - MODE OPERATOIRE.-

Quand le butanediol est en solution pure, placer 10 cm³ de solution contenant 100 à 500 μ g de butanediol dans une ampoule de 20 cm³; ajouter 1 cm³ de A' (acide sulfurique à 15 %), 4 cm³ d'eau de brome 0,4 N. Porter pendant 15 min. l'ampoule scellée dans un bain-marie fermé maintenu à une température comprise entre 75° et 80° : le butanediol est ainsi transformé en acétoïne. Refroidir l'ampoule sous courant d'eau, ouvrir, ajouter 1 cm³ de C' (sulfate ferreux cristallisé à 30 %) pour réduire le brome, et transvaser dans le ballon de 100 cm³ (fig. 2 p. 23); ajouter 3,5 cm³ de B' (chlorure ferrique à 50 %); 5 cm³ de C', quelques grains de pierre ponce. Associer le ballon et la colonne à distiller, et continuer suivant le mode opératoire donné pour le dosage de l'acétoïne.

Quand le butanediol est en solution complexe, au lieu d'ajouter 4 cm³ d'eau de brome 0,4 N, il faut ajouter suivant les cas 5, 6, 7 ou 8 cm³ de cette solution, de façon que, après passage de l'ampoule dans le bain-marie, il reste une quantité de brome équivalente à celle de 3,5 + 1 cm³ d'eau de brome 0,4 N. Dans chaque cas nouveau, il faut donc déterminer par 1 ou 2 essais préalables, laquelle de ces 4 quantités d'eau de brome remplit la condition précédente, et pour cela doser iodométriquement dans ces essais le brome restant après passage de l'ampoule au bain-marie (en raison de la tolérance assez grande de cette condition, on peut, dans des études systématiques faites sur des milieux semblables, déterminer à l'avance une fois pour toutes quelle doit être la quantité d'eau de brome à utiliser).

Dans les deux cas le butanediol est finalement transformé en diméthylglyoxime avec un rendement de 89,5 + 2,5 %; pour avoir à 3 % près le poids de butanediol dans la prise d'essai, multiplier le poids de diméthylglyoxime par $\frac{90}{116} \times \frac{1}{89,5} = 0,867$. S'il y a de l'acétoïne dans la prise d'essai, déduire du poids total de diméthylglyoxime le poids de diméthylglyoxime correspondant à l'acétoïne, et multiplier cette différence par 0,867.

3. JUSTIFICATION DU MODE OPERATOIRE

Les expériences relatées dans ce paragraphe ont été faites à partir du butanediol optiquement inactif fourni par une firme hollandaise (cf. p. 24); ce produit purifié par 2 distillations successives avait pour point d'ébullition 178° et pour point de fusion 27° environ.

I - DOSAGE DU BUTANEDIOL DANS UNE SOLUTION PURE.-

La quantité d'acide sulfurique peut sans inconvénient être

modifiée de + 50 % et la quantité d'eau de brome de + 20 %. Au lieu d'utiliser une solution saturée de brome dans l'eau distillée, nous avons voulu utiliser le réactif A (cf. p. 14), solution de brome et de bromure de potassium dans l'eau distillée; nous y avons renoncé parce que les rendements de l'oxydation du butanediol étaient alors plus faibles; cette action défavorable du bromure de potassium sur les rendements avait d'ailleurs été déjà signalée par Kniphorst et Kruisheer (39).

On remarque que nous ajoutons 3,5 cm³ de chlorure ferrique au lieu d'en ajouter 4 cm³ comme dans un dosage ordinaire d'acétoïne; nous tenons compte ainsi de la formation de Fe (III) qui résulte de la réduction par le sulfate ferreux du brome restant après passage de l'ampoule au bain-marie.

Pour une durée donnée du chauffage, les résultats sont les mêmes que la température du bain-marie soit de 75° ou de 80°; si la température est de 85° les résultats sont légèrement inférieurs.

Pour une température de 80°, la variation du rendement final en diméthylglyoxime, en fonction du temps de chauffage de l'ampoule au bain-marie, est représentée par la fig. 3 qui correspond au tableau VII; on voit que le temps de chauffage peut varier entre 13 et 16 min. sans que les résultats changent de façon appréciable.

Le tableau VIII montre que pour des quantités de butanediol allant de 129 à 515 μ g, les rendements en diméthylglyoxime sont de $89,5 \pm 2,5$ %.

VARIATION DU RENDEMENT EN DIMETHYLGLYOXIME

en fonction du temps de chauffage à 80°

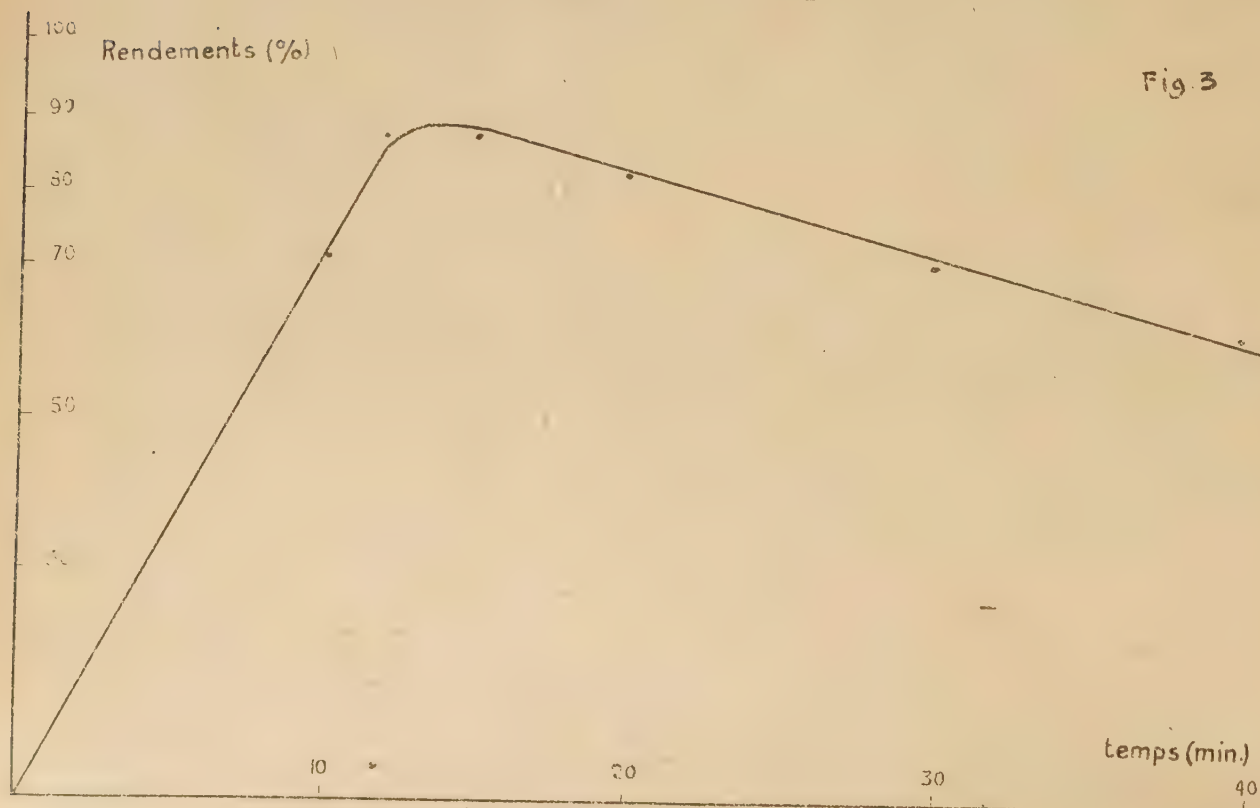


Fig. 3

TABLERAU VII

Durée du rechauffage (min.)	Valeurs four- nies par l' électropho- tomètre	Poids de dimé- thylglyoxime (μg)		Rendements %
		trouvé	calculé	
0	24			
10	262	472	664	71,1
12	309	578	"	87,3
15	308	576	"	87,1
18	304	567	"	85,5
20	295	545	"	82,2
30	259	468	"	70,5
40	231	408	"	61,5

Expériences faites sur des prises d'essai contenant 515 μg de butanediol.

TABLERAU VIII

RENDEMENTS EN DIMETHYLGLYOXIME

pour des quantités variables de butanediol

Poids de bu- tanediol dans la prise d'essai (μg)	Valeurs four- nies par l' électrophoto- mètre	Poids de diméthyl- glyoxime (μg)		Rendements (%)
		trouvé	calculé	
0	24			
129	98	145	166	87,4
218,5	157	257	282	91
328	222	388	423	91,9
437	270	492	564	87,3
515	308	576	664	87,1

II - DOSAGE DU BUTANEDIOL DANS UNE SOLUTION COMPLEXE.-

Il est légitime d'admettre que, dans les conditions de notre mode opératoire, seul le butanediol peut donner de l'acétoïne et par suite du diacétyl, de la diméthylglyoxime et de la diméthylglyoxime nickélique (cf. tableau I, p. 19); nous avons d'ailleurs vérifié directement que dans ces conditions le glucose, les acides lactiques et butyriques, les alcools butyliques et isobutyliques, le glycérol, ne donnaient pas de diméthylglyoxime nickélique, non plus que des colorations faussant le dosage de celle-ci. C'est donc essentiellement parce qu'ils consomment du brome que les composés accompagnant le butanediol sont gênants.

D'après ce qui précède, pour un dosage de butanediol dans une solution pure, la quantité d'eau de brome 0,4 N doit être de 4 + 1 cm³, et nous avons constaté qu'il ne reste après passage de l'ampoule au bain-marie qu'une quantité de brome équivalente à celle de 3,5 + 1 cm³ d'eau de brome 0,4 N (en particulier, il y a toujours de légères pertes de brome par évaporation lors du remplissage de l'ampoule, de son scellement et de son ouverture). Pour un dosage de butanediol dans une solution complexe, l'expérience montre que la quantité de brome restant après passage de l'ampoule au bain-marie doit être également équivalente à celle de 3,5 + 1 cm³ d'eau de brome 0,4 N. En pratique ceci conduit à ajouter, au lieu de 4 cm³ d'eau de brome 0,4 N, 6 ou 8 cm³ de cette solution quand la prise d'essai contient 100 ou 200 mg. de glucose; 5,6 ou 7 cm³ quand la prise d'essai contient 100, 200 ou 300 mg. de glycérol, etc.....

Le butanediol est fréquemment accompagné par de l'acétoïne; nous avons constaté que la destruction de ce composé au cours du traitement par l'eau de brome est nulle aux erreurs d'expériences près, d'où la règle donnée dans notre mode opératoire pour calculer le poids de butanediol quand la prise d'essai contient de l'acétoïne. Le butanediol peut ainsi être dosé correctement en présence de quantités d'acétoïne 3 fois plus grandes. S'il y a davantage d'acétoïne, la précision du dosage du butanediol s'en trouve diminuée; pour maintenir cette précision à sa valeur habituelle on peut éliminer une partie de l'acétoïne par distillation fractionnée, ou le détruire sélectivement (39):

La prise d'essai ne doit pas contenir en abondance des composés volatils tels que l'éthanol, qui consomment des quantités de brome particulièrement grandes. Mais ces composés se séparent aisément du butanediol par distillation fractionnée. Ainsi, dans le cas particulier des vins qui, par litre, contiennent environ 100 g. d'éthanol et 600 mg. de butanediol (74), nous opérons conformément au mode opératoire suivant : Dans le ballon de 250 cm³ (fig. 2 p. 23) placer 5 cm³ de vin, 95 cm³ d'eau et distiller lentement 10 cm³ exactement :

la presque totalité de l'éthanol passe dans le distillat tandis que le butanediol demeure intégralement dans les 90 cm³ de solution restant dans le ballon. Doser le butanediol sur 10 cm³ de cette solution (en utilisant 5 cm³ d'eau de brome 0,4 N pour effectuer l'oxydation du butanediol en acétofne). Pour avoir le poids de butanediol dans la prise d'essai initiale de 5 cm³, multiplier le poids trouvé de diméthylglyoxime par

$$\frac{90}{116} \times \frac{1}{89,5} \times \frac{90}{10} = 7,8.$$

Si on veut doser directement le butanediol dans certains milieux biologiques spécialement pauvres en ce composé (urine) on se heurte à différentes difficultés déjà signalées précédemment (cf. chapitres II et IV). Par contre notre méthode s'applique sans aucune difficulté aux milieux ayant subi une fermentation butanediolique typique.

DEUXIEME PARTIE

EXEMPLES D'APPLICATION DE NOS NOUVELLES METHODES ANALYTIQUES

Nous avons dit que nos méthodes analytiques ont été spécialement établies pour l'étude des fermentations butanedioliques typiques. Elles s'appliquent cependant à des milieux moins riches en butanediol ou en acétofne, soit avec certaines modifications dépendant de la composition particulière du milieu étudié, soit même sans modifications; nous en donnons ici des exemples.

Nous dosons d'abord l'acétofne et le butanediol dans certains milieux de fermentation alcoolique, afin de comparer les résultats fournis par nos méthodes et par des méthodes différentes récemment proposées pour ces milieux. Puis nous caractérisons et dosons le butanediol dans des milieux particulièrement pauvres en ce composé : milieux fermentés par bacillus cereus et bacillus megatherium; cela n'avait pas été fait jusqu'ici faute d'une méthode analytique suffisamment spécifique et sensible. Enfin nous montrons que des suspensions lavées de bacillus subtilis transforment l'acide pyruvique en acétofne lévogyre avec production concomitante de gaz carbonique.

CHAPITRE I

L'ACETOINE ET LE BUTANEDIOL DANS LES MILIEUX DE FERMENTATION ALCOOLIQUE

A l'aide de méthodes personnelles, Peynaud (74,79) a déterminé récemment la concentration de l'acétoïne et du butanediol dans divers milieux de fermentation alcoolique. Pour estimer la concentration de l'acétoïne, cet auteur utilise une technique qui dérive de la méthode générale de Lemoigne (46), et qui repose par conséquent sur la formation de diméthylglyoxime nickeleuse. Pour doser le butanediol, il propose une méthode originale fondée sur l'oxydation périodique de ce composé en 2 molécules d'éthanal; cette réaction en elle-même n'est pas spécifique du butanediol : un grand nombre de composés organiques (acide lactique, glycérol, sucres, etc...) donnent en effet par oxydation périodique des produits aldéhydiques variés; mais d'après Peynaud, il est possible d'éliminer l'influence de ces composés en séparant le butanediol par un entraînement à la vapeur, et en faisant suivre l'oxydation périodique d'un blocage sélectif par l'asparagine du méthanal (qui provient de l'oxydation du glycérol), à l'exclusion de l'éthanal (qui provient de l'oxydation du butanediol).

Il nous a paru intéressant d'appliquer nos propres méthodes analytiques à certains des milieux déjà étudiés par Peynaud, afin de comparer entre eux les résultats obtenus. Nous avons été conduits ainsi à rechercher le butanediol dans le bouillon de levure, et à doser l'acétoïne et le butanediol dans 3 vins différents.

1.- RECHERCHE DU BUTANEDIOL DANS LE BOUILLON DE LEVURE.-

Peynaud signale, à vrai dire dans une brève remarque, que le bouillon de levure préparé en faisant bouillir 100 g. de levure pressée de boulangerie dans un litre d'eau, renferme environ 300 mg. de butanediol, ce qui correspond à 3 g. de ce glycol par kg. de levure fraîche. Ces chiffres présentant pour les recherches que nous poursuivons un intérêt marqué, nous nous sommes proposés de les vérifier, mais toutes les tentatives que nous avons faites dans ce but ont conduit à des résultats négatifs.

Dans une première série d'essais, nous avons préparé une suspension à 10 % de levure pressée de boulangerie dans l'eau ordinaire, nous l'avons portée à l'ébullition sous réfrigérant ascendant pen-

tant $\frac{1}{2}$ h., 1 h. ou 2 h.; et avons recherché le butanediol dans le bouillon avant et après centrifugation. En aucun cas, nous n'avons pu caractériser ce composé.

Puis nous avons travaillé sur des levures de provenances différentes, et nous avons préparé des bouillons en portant à l'ébullition sous réfrigérant ascendant, pendant $\frac{1}{2}$ h., des suspensions à 10 % de ces levures dans l'eau ordinaire, et en centrifugeant ensuite. Toutes les tentatives de caractérisation du butanediol dans ces bouillons ont encore été négatives, ce qui signifie plus précisément que les concentrations en butanediol de ces bouillons sont inférieures à 30 mg/l. (tableau IX).

Pour nous assurer que ces résultats négatifs n'étaient pas dus à une imperfection de notre méthode analytique, nous avons ajouté des quantités connues de butanediol dans les bouillons précédents, puis nous en avons refait l'analyse. Nous avons alors été conduits à des résultats corrects (tableau IX).

Enfin pour éliminer des causes d'erreurs dues à des variations éventuelles dans la composition des levures commerciales, nous avons refait une partie de ces essais à plusieurs semaines d'intervalle: les résultats ont été identiques.

TABIEAU IX

Non existence du butanediol dans le bouillon de levure

Provenance de la levure	Quantité de butanediol dans le bouillon (mg./l.)	Quantité de butanediol ajoutée (mg./l.)	Quantité de butanediol retrouvée (mg./l.)	Erreur (%)
Springer	3	48,8	47,6	- 2,5
Parisiennne	id.	48,4	49,8	+ 3
Lesaffre	id.	47,8	47,8	0
Chaulmes	id.	51,5	49,7	- 3,5
Impériale	id.	47,6	47,1	- 1

Tous ces essais montrent que la levure pressée de boulangerie ne contient pas de butanediol; ils montrent également que notre méthode permettrait parfaitement de doser à 3 % près le butanediol dans un milieu aussi complexe que le bouillon de levure, si ce composé y

était présent à des doses de l'ordre de 50 mg./l.

Nous avons fait part de ces conclusions à Monsieur Peynaud qui a reconnu que le butanediol n'existe pas dans la levure pressée de boulangerie. L'inexactitude de son résultat est due sans doute à une erreur fortuite qui, quelle qu'elle soit, ne met en cause le principe même de sa méthode : ayant en effet refait le dosage du butanediol dans un bouillon de levure fraîchement préparé, Monsieur Peynaud a bien trouvé comme il convenait des résultats négatifs (communication personnelle).

2.- DOSAGE DE L'ACÉTOÏNE ET DU BUTANEDIOL DANS LES VINS

Nos mesures ont porté sur 2 vins blancs et 1 vin rouge dont Monsieur Peynaud avait fait l'analyse et dont il a eu l'obligeance de nous faire parvenir des échantillons. Dès réception de ceux-ci nous avons dosé l'acétoïne et le butanediol conformément au mode opératoire décrit précédemment. Les résultats de Peynaud et les nôtres sont rassemblés dans le tableau X.

TABEAU X

Dosage de l'acétoïne et du butanediol dans 3 vins

Désignation des vins	Dosage de l'acétoïne (résultats en mg./l.)		Dosage du butanediol (résultats en mg./l.)	
	Méthode Peynaud	Méthode Hooreman	Méthode Peynaud	Méthode Hooreman
Graves de Portets	9	12	675	614
Loupiac	0	< 2	922	854
St Emilion	18	20	756	684

Pour le dosage de l'acétoïne, nos résultats sont un peu supérieurs à ceux de Peynaud; l'accord entre ces résultats est cependant assez bon, compte tenu des difficultés présentées par le dosage de l'acétoïne dans les vins. Les vins sont en effet des milieux très complexes qui, par litre, contiennent environ 100 g. d'éthanol et, au plus,

20 mg. d'acétoïne seulement; dans ces conditions la précision du dosage de l'acétoïne ne peut pas être très grande.

Pour le dosage du butanediol, nos résultats sont inférieure à ceux de Peynaud, de 8 à 10 %, ces écarts sans être négligeables, apparaissent comme faibles si l'on considère que les méthodes analytiques en présence reposent sur des principes entièrement différents. Des travaux ultérieurs donneront probablement l'explication de ces écarts.

Ainsi, d'après les 3 exemples du tableau X, les méthodes analytiques de Peynaud et les nôtres conduisent à des résultats voisins. Ceci dit, nous ferons remarquer que les résultats de Peynaud (74) relatifs à la concentration du butanediol dans un grand nombre de vins, sont dans l'ensemble très supérieurs à des résultats similaires publiés par Diemair et Kleber (15). Ces auteurs trouvent pour 35 vins analysés une concentration moyenne en butanediol de 363 mg./l., tandis que Peynaud indique une concentration moyenne de 578 mg./l. pour 26 vins blancs, et de 683 mg./l. pour 47 vins rouges. Sans doute ces analyses portent sur des vins différents, cependant on peut se demander si cette raison suffit à expliquer l'écart que nous constatons. Nous pensons quant à nous que cet écart est dû partiellement au fait que la méthode analytique de Diemair et Kleber, qui dérive de celle de Kniphorst et Kruisheer (39), est nettement déficiente.

Nous venons de voir que, d'après les 3 exemples du tableau X, les méthodes analytiques de Peynaud et les nôtres conduisent à des résultats voisins; il nous reste toutefois à préciser que nos méthodes sont beaucoup plus rapides et sensibles. En outre, nous estimons que, dans certains cas particuliers, la méthode proposée par Peynaud pour le dosage du butanediol, ou les nombreuses méthodes récentes fondées également sur l'oxydation périodique de ce composé (34, 55, 65, 71) risquent de conduire à des résultats incorrects, par suite de la non-spécificité de la réaction qu'elles utilisent et en dépit des artifices indiqués pour remédier à cette non spécificité; ces artifices ne nous paraissent pas en effet d'une efficacité absolument générale.

3.- CONCLUSIONS

Le bouillon de levure, et par suite la levure pressée de boulangerie ne contiennent pas de butanediol; nos méthodes analytiques permettraient parfaitement d'ailleurs de doser à 3 % près le butanediol dans un milieu aussi complexe que le bouillon de levure, si ce composé y était présent à des doses de l'ordre de 50 mg./l.

Nos méthodes analytiques fournissent pour le dosage l'acétoïne et du butanediol des résultats respectivement supérieurs et inférieurs aux résultats fournis par les méthodes de Peynaud, mais les écarts sont faibles. Nos méthodes sont donc sensiblement équivalentes à celles de Peynaud quant aux chiffres qu'elles donnent, mais elles sont beaucoup plus rapides et sensibles.

CHAPITRE II

CARACTERISATION DU BUTANEDIOL DANS DES MILIEUX PAUVRES EN CE COMPOSE

Nous avons signalé, tout au début de ce travail, des microbes nombreux et divers provoquant la formation de petites quantités d'acétoïne. Il était à prévoir que les milieux fermentés par ces microbes contiennent également du butanediol. Mais, faute d'une méthode analytique suffisamment spécifique et sensible, la recherche et le dosage du butanediol dans ces milieux n'ont pas encore été tentés systématiquement, ou ont été tentés sans succès. Par exemple, Yamasaki et Karasima (106) ont trouvé que les milieux fermentés par Clostridium acetobutylicum contiennent jusqu'à 600 à 700 mg./l. d'acétoïne, mais ont obtenu des résultats négatifs en recherchant le butanediol.

A l'aide de nos méthodes, qui sont spécifiques, et sont par conséquent tout autant des méthodes de caractérisation que des méthodes de dosage, il devient très facile de mettre en évidence le butanediol dans de tels milieux. Nous en donnons 2 exemples.

1.- MILIEUX FERMENTES PAR BACILLUS CEREUS.

Lemoigne (51) a signalé que B. cereus, ensemencé dans du bouillon de haricot peptoné et glucosé, produit de petites quantités d'acétoïne, mais que certaines souches paraissent n'en pas produire du tout quand on effectue la recherche de ce composé sur une prise d'essai de 100 cm³, en utilisant la méthode analytique fondée sur la formation de diméthylglyoxime nickeleuse. Dentice di Accadia (12), utilisant nos méthodes fondées sur la formation de diméthylglyoxime nickelique, et partant d'une prise d'essai de 10 cm³ seulement, a au contraire mis nettement l'acétoïne en évidence dans des milieux fermentés par 5 souches de B. cereus, qui avaient été précisément choisies parmi celles paraissant ne pas produire d'acétoïne dans les conditions opératoires observées par Lemoigne. En outre Dentice di Accadia a trouvé que ces 5 souches produisaient également des petites quantités de butanediol.

Dans ces essais la technique expérimentale est la suivante : le milieu de culture est du bouillon de haricots contenant 0,25 % de

phosphate diammonique, 0,25 % d'autolysat de levure, et 2,5 % de glucose; il est réparti stérilement à raison de 120 cm³ par boîte de Roux; Chaque boîte après ensemencement est laissée 24 h. dans une étuve à 30°; le dosage de l'acétoïne et du butanediol est alors effectué sur 2 prises d'essai de 10 cm³ chacune.

TABEAU XI

PRODUCTION D'ACETOÏNE & DE BUTANEDIOL PAR BACILLUS CEREUS

Désignation de la souche	7 A19	8 A8	8 A13	8 B4	8 C2
acétoïne (mg./l.)	20	15	30	5	12
butanediol (mg./l.)	40	22	32	5	2

Les résultats obtenus sont donnés par le tableau XI. On voit que toutes les souches étudiées produisent du butanediol, en petites quantités d'ailleurs : la concentration de ce composé dans le milieu de culture varie suivant les souches entre 2 et 40 mg./l. Dentice di Accadia a encore montré dans d'autres essais que la production du butanediol par une souche déterminée varie beaucoup avec la durée de l'expérience.

2. MILIEUX FERMENTES PAR BACILLUS MEGATHERIUM

Lemoigne a montré que B. megatherium cultivé en milieu liquide agité produit de petites quantités d'acétoïne (50). Cette production varie beaucoup avec la souche étudiée; en particulier il semble qu'une souche entretenue par repiquages successifs sur bouillon de haricots gélosé perde progressivement son aptitude à produire de l'acétoïne.

B. megatherium ne forme pas de voile à la surface des milieux liquides, et comme il est aérobic strict, il pousse très mal dans les milieux liquides non agités. Au contraire en milieu aéré agité il donne des cultures abondantes. Dans ces conditions fortement aérobies le butanediol n'apparaît pas (tableau XII, expérience 1); par contre si après l'ensemencement on commence par agiter le milieu pendant 2 jours, pour permettre la multiplication du microbe, et si on arrête ensuite

l'agitation, on trouve dans le milieu de petites quantités du butanediol qui finalement disparaissent en donnant probablement de l'acétoïne (tableau XII, expérience 2).

La technique expérimentale utilisée est la suivante : nous préparons un milieu de culture synthétique 500 mg. de $PO_4^{4-} KH_2$, 15 mg. de $SO_4^{4-} Mg$, 7 H_2O , 3 mg. de $SO_4^{4-} Mn$, 4 H_2O , 3 mg. de $SO_4^{4-} Fe$, 7 H_2O , 1000 mg. de $NO_3^- K$ et 4000 mg. de glucose pour 100 cm³ d'eau de source; nous ajustons par addition de soude à pH6 environ. Nous ensemençons avec une souche de *B. megatherium* fraîchement isolée du sol, et nous répartissons dans 2 flacons d'Erlenmeyer de 1000 cm³ stérilisés au préalable, à raison de 100 cm³ par flacon. Nous portons ces 2 flacons dans une étuve à 31°; nous les fixons sur un agitateur mécanique faisant par minute 30 oscillations de 20 cm. d'amplitude environ; au bout de 48 heures nous ôtons l'un des 2 flacons de l'agitateur. Dans chacun de ces flacons nous dosons à différents moments l'acétoïne et le butanediol sur des prises d'essai de 2 cm³ prélevées aseptiquement.

TABEAU XII

PRODUCTION D'ACETOÏNE & DE BUTANEDIOL PAR B. MEGATHERIUM

Durée de l'expérience (jours)	<u>Expérience 1</u> (l'agitation est maintenue pendant la durée de l'expérience)		<u>Expérience 2</u> (l'agitation est maintenue pendant les 2 premiers jours de l'expérience; elle est ensuite arrêtée)	
	acétoïne (mg./l.)	butanediol (mg./l.)	acétoïne (mg./l.)	butanediol (mg./l.)
1	35	0	25	0
2	75	0	90	0
3	29	0		
4	24	0	80	60
7			117	5

Les résultats obtenus sont donnés par le tableau XII. On voit qu'il n'y a jamais apparition de butanediol dans le flacon agité en permanence (expérience 1), mais que dans l'autre flacon il s'est formé

après l'arrêt de l'agitation 60 mg./l. de butanediol; ce composé finalement disparaît en donnant probablement de l'acétoïne (expérience 2).

3. CONCLUSIONS

Dans les conditions décrites b. cereus et b. megatherium produisent de petites quantités de butanediol généralement inférieures à 50 mg./l.; cette production varie beaucoup suivant la souche étudiée et les conditions expérimentales.

Ces résultats, obtenus par nos nouvelles méthodes analytiques, n'auraient pu s'établir à l'aide des nombreuses méthodes récemment proposées pour le dosage du butanediol, qui sont moins spécifiques et sensibles.

Généralisant ces résultats particuliers obtenus avec b. cereus et b. megatherium, nous dirons que, si la production d'acétoïne par les microbes est très fréquente, la production de butanediol ne l'est vraisemblablement pas moins. Il y aurait donc lieu de rechercher systématiquement le butanediol dans les milieux biologiques, à l'aide de nos nouvelles méthodes; il se pourrait qu'ainsi on trouve le butanediol dans des milieux où l'acétoïne n'existe pas ou n'a pas encore été signalée, et où par conséquent la présence du butanediol n'est nullement soupçonnée.

— 2 —

CHAPITRE III

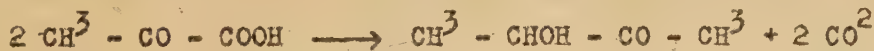
FORMATION D'ACETOINE AUX DEPENS DE L'ACIDE PYRUVIQUE

PAR BACILLUS SUBTILIS

Le mécanisme de la formation d'acétoïne par les organismes a fait l'objet de travaux nombreux et contradictoires. D'après Neuberg, cette formation se ferait, dans le cas de la levure, par condensation de 2 molécules d'éthanal sous l'influence d'un enzyme spécial : la carboligase (21); l'existence de cet enzyme a été confirmée par différents auteurs, mais a été également contestée, notamment par Dirscherl (21). L'une des 2 molécules d'éthanal, nécessitée par la réaction précédente, semble devoir, au moins dans certains cas, provenir de la décarboxylation de l'acide pyruvique.

Aux travaux signalés dans l'article que nous venons d'indiquer (21), il convient d'ajouter ceux de Johnson et Coll. (35), qui ont mis en évidence une transformation partielle de l'acide pyruvique en acétoïne par clostridium acetobutylicum; de Tanko et coll. (90) qui ont étudié l'activité optique de l'acétoïne formée aux dépens de l'acide pyruvique par certains tissus animaux; de Stahly et Werkman (85), qui, par addition d'éthanal dans des cultures de aerobacillus polymyxa, ont obtenu un accroissement de la formation d'acétoïne et de butane-diol; de Silverman et Werkman (83), Green et coll. (22), qui ont montré que des extraits enzymatiques provenant d'un microbe (aerobacter aerogenes), de tissus animaux variés (cœur, cerveau, rein de porc; muscles de lapin, de pigeon, de cheval), étaient capables de transformer l'acide pyruvique en acétoïne.

L'acétoïne aurait donc pour précurseurs, soit l'acide pyruvique, soit l'éthanal, soit ces 2 composés simultanément, conformément aux réactions globales :



Dans le cas particulier de bacillus subtilis, le seul travail approfondi qui, à notre connaissance, ait été fait sur le mécanisme de la formation d'acétoïne, est dû à Lafon (40). Cet auteur a

obtenus des résultats négatifs en essayant de montrer que l'acétoïne est alors également formée aux dépens de l'acide pyruvique ou de l'éthanal. Les divergences constatées entre ces résultats et les résultats précédents, suggéreraient l'existence possible de plusieurs systèmes formateurs d'acétoïne, très différentes suivant les organismes.

Nous avons obtenu au contraire des résultats tout à fait positifs en recherchant si l'acide pyruvique pouvait être transformé en acétoïne par b. subtilis; nos résultats sont par conséquent en faveur d'une certaine ressemblance entre le système formateur d'acétoïne existant chez b. subtilis, et ceux qu'on trouve chez des organismes différents : microbes divers, levure, tissus animaux. Les expériences que nous allons décrire dans cette étude préliminaire, ont été faites à partir de l'acide pyruvique seulement, et non à partir de l'éthanal.

I - TECHNIQUE EXPERIMENTALE & RESULTATS

Nous avons mis en contact, en tampon phosphaté, des quantités connues de pyruvate de sodium et des suspensions diversement préparées de b. subtilis.

Ces bactéries avaient été obtenues en cultivant en boîte de Roux, pendant un temps donné, la souche B S 201₂ du service des fermentations de l'Institut Pasteur, dans un milieu contenant 60 g. de peptone bactériologique Vaillant, 60 g. de $\text{PO}_4^{4-}\text{NH}_4^+\text{H}_2$, 30 g. de $\text{PO}_4^{4-}\text{K}^+\text{H}_2$, 2 g. de $\text{SO}_4^{4-}\text{Mg}$, 7 H_2O , 0,3 g. de $\text{SO}_4^{4-}\text{Mn}$, 4 H_2O , 0,3 g. de $\text{SO}_4^{4-}\text{Fe}$, 7 H_2O , 2,0 g. de saccharose, pour 8.000 cm³ d'eau de source. Après fermentation, le milieu était éliminé aussi complètement que possible par centrifugation et décantation. Les bactéries étaient ensuite lavées par une remise en suspension dans l'eau distillée suivie également d'une centrifugation et d'une décantation; ce lavage était répété un nombre variable de fois suivant l'expérience.

Tous les essais ici décrits ont été faits en anaérobiose; nous éliminons ainsi la possibilité d'une destruction partielle de l'acétoïne par le microbe lui-même, phénomène qui se manifeste avec une netteté particulière quand le milieu est intensément aéré, et quand d'ailleurs certaines autres conditions sont également remplies (cf. Troisième Partie). Nous avons dosé l'acétoïne et le butanediol par les méthodes établies précédemment, et dans la lère de nos expériences nous avons mis en évidence un dégagement de gaz carbonique à l'aide de l'appareil de Warburg.

A - Transformation de l'acide pyruvique en acétoïne et gaz carbonique.

L'expérience que nous allons décrire est parmi les premières

que nous ayons faites sur le sujet qui nous occupe ici. Craignant alors qu'un lavage n'élimine le système enzymatique formateur d'acétoïne, nous n'avions pas lavé les bactéries, qui provenaient d'une culture de 2 jours; nous avons simplement éliminé la majeure partie du milieu par centrifugation et décantation, puis remis les bactéries en suspension dans l'eau distillée. Aussi ces bactéries demeuraient-elles encore imprégnées par le milieu de culture ayant servi à leur obtention :

1 cm³ de la suspension bactérienne utilisée contenait 112 μ g d'acétoïne et 380 μ g de butanediol, et avait pour poids sec 30,5 mg.

Dans les cupules de l'appareil de Warburg, nous ajoutons 1 cm³ de cette suspension, 1 cm³ d'une solution de pyruvate de sodium M/12,5 ou 1 cm³ d'eau distillée dans l'essai-témoin, et enfin 1 cm³ de tampon phosphaté (mélange de PO⁴KH², M/5 et de PO⁴K²H, M/5 en proportions telles que son pH soit égal à 7,2 - 7,3). Nous remplissons l'appareil avec un mélange gazeux à 90 % d'azote et 10 % de gaz carbonique. Nous opérons à 31°, pendant 150 min.

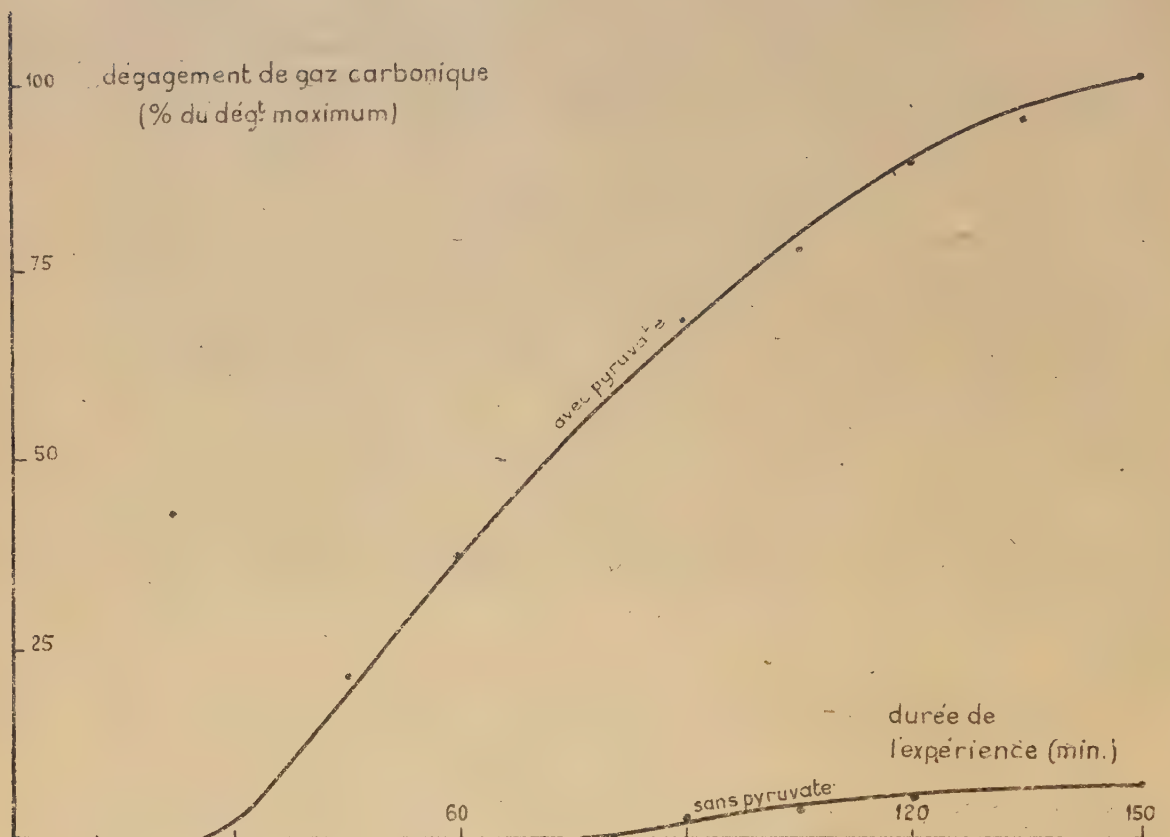
Les résultats obtenus sont donnés par le tableau XIII et la figure 4. Le tableau XIII indique les quantités d'acétoïne et de butanediol existant dans les cupules de l'appareil au début et en fin de chaque essai. La figure 4 représente la variation en fonction du temps du dégagement de gaz carbonique.

TABEAU XIII

FORMATION D'ACETOÏNE AUX DEPENS DE L'ACIDE PYRUVIQUE

Durée de l'expérience (min.)	Essai avec 1 cm ³ de pyruvate M/12,5			Essai-témoin sans pyruvate		
	Acétoïne (μ g)	Butanediol (μ g)	Acétoïne + Butanediol (μ g)	Acétoïne (μ g)	Butanediol (μ g)	Acétoïne + Butanediol (μ g)
0	112	380	492	112	380	492
150	2380	750	3130	298	241	539

Fig. 4 - FORMATION DE GAZ CARBONIQUE AUX DEPENS DE L'ACIDE PYRUVIQUE



Comme dans nos essais les bactéries n'ont pas été lavées, elles apportent avec elles des accepteurs et des donateurs d'hydrogène qui proviennent du milieu ayant servi à leur obtention; ces composés peuvent provoquer une oxydation du butanediol en acétoïne et, inversement, une réduction de l'acétoïne en butanediol. Nous aurons donc à considérer globalement la somme butanediol + acétoïne plutôt que chacun des termes de cette somme séparément. Par comparaison entre l'essai fait avec pyruvate et l'essai-témoin sans pyruvate, on voit qu'il s'est formé aux dépens de ce composé $3.130 - 539 = 2.591 \mu g$ d'acétoïne, dont une partie s'est trouvée réduite en butanediol (tableau XIII). La quantité de pyruvate mise en oeuvre correspondant à 1 cc. de solution M/12,5, la quantité d'acétoïne pouvant se former, calculée d'après l'équation :

$2 \text{CH}^3\text{-CO-COOH} \longrightarrow \text{CH}^3\text{-CHOH-CO-CH}^3 + 2 \text{CO}_2$, est de $3.520 \mu\text{g}$
Par conséquent, la quantité d'acétoïne effectivement formée dans cet essai atteint 73,6 % de la quantité théorique.

La figure 4 montre très nettement qu'il y a dégagement important de gaz carbonique dans l'essai fait avec pyruvate, et non dans l'essai témoin sans pyruvate. Toutefois les chiffres obtenus sont inférieurs à ce qu'ils devraient être, et on ne peut se fier à leur valeur absolue. Cependant les courbes de la figure 4 sont suffisamment distinctes pour que l'on puisse conclure sans ambiguïté à la décarboxylation de l'aide pyruvique par *b. subtilis*.

Nous ferons enfin remarquer que les méthodes analytiques établis précédemment permettent de doser les petites quantités de butanediol formées dans les cupules de l'appareil de Warburg; dans ce cas, les autres méthodes proposées pour le dosage de ce composé seraient en échec, faute de sensibilité et de spécificité. Nos méthodes analytiques, conjuguées avec les méthodes manométriques dont elles complètent les indications, sont donc appelées à rendre de grands services dans l'étude des systèmes enzymatiques conditionnant la formation (ou la destruction - cf. Troisième Partie) de l'acétoïne et du butanediol.

B - Influence du nombre des lavages, et de l'âge de la culture ayant fourni les bactéries.

Dans l'expérience précédente, les bactéries n'ont pas été lavées; aussi nous sommes-nous proposés ensuite d'étudier l'influence du nombre des lavages. Suivant le mode opératoire ci-devant indiqué (cf p. 48), nous avons soumis les bactéries à 3 lavages successifs dans une 1ère série d'essais, et à 9 lavages dans une 2ème série. En outre, nous avons fait varier l'âge des cultures qui nous fournissaient les bactéries : nous avons utilisé des cultures de 1, 3 ou 6 jours. Ainsi que nous l'avons vérifié, les bactéries ayant été lavées 3 ou 9 fois ne contiennent plus ni acétoïne ou butanediol, ni donateurs d'hydrogène susceptibles de réduire l'acétoïne en butanediol; nous n'avons donc à donner ici que les quantités d'acétoïne existant en fin d'essai, et qui se sont formées aux dépens de l'acide pyruvique.

Nous avons précédemment montré que l'acide pyruvique est bien décarboxylé par les suspensions bactériennes; aussi, pour simplifier, nous n'avons pas cherché dans ces nouveaux essais à suivre également la décarboxylation, et nous avons simplement dosé l'acétoïne formée. Pratiquement, dans un tube de Thünnberg, nous ajoutons 1 cm³ de tampon phosphaté (mélange de PO_4KH_2 , M/5 et de $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$, M/5 en pro-

portions telles que son pH soit égal à 7,2-7,3), 1 cm^3 de suspension bactérienne, préparée à partir de bactéries plus ou moins lavées et provenant de cultures plus ou moins âgées (le poids sec des corps bactériens dans 1 cc. de suspension étant toujours égal à environ 10 mg.), et enfin 0,5 cm^3 de pyruvate de sodium M/12,5. Nous faisons le vide dans les tubes, puis nous remplissons avec du gaz carbonique. Nous portons à l'étuve à 31° pendant 150 min., puis nous dosons l'acétoïne formée, et nous vérifions que dans des essais-témoins faits sans pyruvate, la teneur en acétoïne est nulle. Les résultats sont donnés par le tableau XIV.

Tableau XIV - INFLUENCE DU NOMBRE DES LAVAGES
ET DE L'ÂGE DE LA CULTURE AYANT FOURNI LES BACTERIES
SUR LA FORMATION D'ACETOÏNE AUX DEPENS DE L'ACIDE PYRUVIQUE
 (quantité de pyruvate mise en oeuvre : 0,5 cm^3 de solution M/12,5)

Age de la culture ayant four- ni les bactéries (jours)	1ère série d'essais (bactéries lavées 3 fois)			2ème série d'essais (bactéries lavées 9 fois)		
	Poids sec des corps bactériens (mg.)	Acétoïne formée au total (g.)	Poids par mg. de corps bactérien (g.)	Poids sec des corps bactériens (mg.)	Acétoïne formée au total (g.)	Poids par mg. de corps bactérien (g.)
1	13,5	1.750	130	9,5	1.670	176
3	8	348	43,5	8	452	56,5
6	11,5	411	35,7		471	

La quantité de pyruvate mise en oeuvre correspondant à 0,5 cm^3 de solution M/12,5, la quantité d'acétoïne pouvant se former est de 1.760 g. On voit donc qu'avec les bactéries provenant d'une culture âgée d'un jour, la quantité d'acétoïne effectivement formée est égale à la quantité théorique, aux erreurs d'expériences près.

On constate que, dans les conditions de nos essais, des lavages même répétés n'éliminent pas apparemment le système formateur

d'acétoïne. Par contre l'âge de la culture ayant fourni les bactéries a sur les résultats une influence très marquée. Cette influence apparaît encore plus nettement d'ailleurs, si la quantité de pyruvate mise en oeuvre avait été plus grande. En effet, dans le cas des cultures âgées d'un jour, le facteur limitant la formation d'acétoïne est la quantité de pyruvate, tandis que dans le cas des cultures âgées de 3 ou 6 jours ce facteur limitant est la quantité de corps bactériens, le pyruvate étant alors en excès; or pour que les chiffres obtenus aient leur pleine signification, il eût fallu, dans tous les cas, un excès de pyruvate.

C - Pouvoir rotatoire de l'acétoïne formée

Afin de rechercher si l'acétoïne formée était optiquement active, nous avons essayé d'obtenir des quantités importantes de ce composé.

Dans une fiole de Fourneau de 1.000 cm^3 , nous plaçons une suspension en tampon phosphaté de bactérie lavées 4 fois. Ces bactéries provenaient d'une culture âgée d'un jour, et leur poids sec était au total de 3 g. environ. Nous ajoutons 12,5 g. de pyruvate de sodium en solution dans 50 cm^3 d'eau distillée stérile. Nous déplaçons l'air contenu dans la fiole par un courant de gaz carbonique, et nous portons cette fiole (munie d'une ouverture permettant le départ de l'excès de gaz carbonique, qui proviendra de la décarboxylation de l'acide pyruvique) dans une étuve à 31°.

Un dégagement gazeux très net ne tarde pas à se manifester; des prélèvements faits au bout de 30, 120, 210 min. montrent que la fiole contient alors respectivement : 0,67, 3,24, 3,93 g. d'acétoïne (d'après l'équation $2\text{CH}_3\text{-CO-COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{-CHOH-CO-CH}_3 + 2\text{CO}_2$, la quantité d'acétoïne pouvant se former est de 5 g.). Dans un essai-témoin sans pyruvate, la teneur en acétoïne est constamment nulle. Après 210 min. de séjour à l'étuve, nous centrifugeons et nous distillons l'acétoïne sous pression ordinaire. Nous constatons alors que l'acétoïne passant dans le distillat a pour pouvoir rotatoire spécifique :

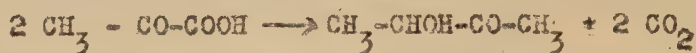
$$(\alpha)_D^{15} (\text{c} = 1,63 \% \text{ dans l'eau}) = -18,4$$

Nous rappelons à ce propos que l'acétoïne obtenue en cultivant *b. subtilis* en milieu sucré est également lévogyre, et que d'après Tomiyasu (95), le pouvoir rotatoire spécifique de l'acétoïne produite par *b. mesentericus fuscus* (microbe voisin de *b. subtilis*) varie entre -28,8 et -78,7. Ces chiffres supérieurs au nôtre, mais, dans nos essais, il s'est peut-être fait une racémisation partielle de

l'acétoïne, au cours de la distillation. De toutes façons nous pouvons dire que des suspensions de b. subtilis transforment l'acide pyruvique en acétoïne lévogyre.

II - CONCLUSIONS.

Des suspensions lavées de b. subtilis transforment l'acide pyruvique en acétoïne lévogyre, avec production concomitante de gaz carbonique; les bactéries provenant d'une culture jeune, âgée d'un jour, sont à cet égard plus actives que celles provenant d'une culture vieille, âgée de 3 ou 6 jours; la quantité d'acétoïne formée peut atteindre 100 % de la quantité théorique, calculée d'après l'équation :



Le système formateur d'acétoïne existant chez b. subtilis présente donc une certaine ressemblance avec ceux qu'on trouve chez d'autres organismes : microbes divers, levure, tissus animaux. Cette ressemblance était jusqu'ici masquée par les résultats négatifs de Lafon.

Si dans les cultures de b. subtilis en milieu sucré on voit d'abord apparaître le butanediol et non l'acétoïne, c'est sans doute que l'acétoïne formée aux dépens de l'acide pyruvique est immédiatement réduite en butanediol par un donateur d'hydrogène approprié dont l'identification reste à faire. Quant à l'oxydation inverse, du butanediol en acétoïne, qui ensuite s'effectue progressivement, elle est due très probablement à l'action de l'oxygène de l'air.

Nos conclusions sont donc opposées à celles de Lafon, qui a obtenu des résultats négatifs en cherchant à montrer que l'acétoïne, formée aux dépens des glucides par b. subtilis, doit avoir pour précurseur l'acide pyruvique ou l'éthanal. Nous pensons que les résultats négatifs de Lafon sont dus, peut-être à un choix malheureux de la souche bactérienne, et surtout à l'utilisation de conditions expérimentales défavorables. Par exemple, Lafon cultive en aérobiose b. subtilis dans un milieu à base de pyruvate et ne trouve pas d'acétoïne, d'où il conclut à la non-formation de ce composé; or il se pourrait, dans ces conditions, que l'acétoïne se soit pourtant effectivement formée mais qu'elle ait été aussitôt détruite par le microbe lui-même; nous verrons précisément que b. subtilis est parfaitement capable de détruire rapidement ce composé (cf. Troisième Partie).

TROISIEME PARTIE

DESTRUCTION DU BUTANEDIOL ET DE L'ACETOINE

PAR LES MICROBES.

A l'aide des méthodes analytiques précédemment décrites, nous avons entrepris, en collaboration avec plusieurs chercheurs, une étude générale sur la destruction du butanediol et de l'acétoïne par les microbes. Un tel sujet de recherches nous a paru spécialement intéressant parce qu'il doit logiquement conduire à la connaissance du rôle physiologique éventuellement joué par la fermentation butanediolique. Notre étude, loin d'être terminée se poursuit actuellement; cependant nous pourrions en donner déjà les premiers résultats, obtenus avec un microbe du groupe du bacillus subtilis et avec bacillus megatherium.

Le problème de la destruction du butanediol et de l'acétoïne par les microbes a donné lieu à des travaux contradictoires : certains auteurs considèrent ces composés comme des produits finaux inutilisables de la glycolyse; d'autres signalent au contraire leur destruction par divers microbes. Le plus souvent d'ailleurs, c'est seulement la destruction de l'acétoïne qu'on a envisagée, sans l'étudier toujours rigoureusement. En effet, pour affirmer qu'un microbe détruit l'acétoïne, il faut s'assurer qu'il n'y a pas simplement réduction de ce composé en butanediol; or plusieurs auteurs qui ont étudié la question, ne disposant pas d'une méthode analytique convenable pour le butanediol, ne dosaient pas ce composé.

Nous ne ferons pas ici une bibliographie complète de la question; ceci nous conduirait à examiner des travaux essentiellement bactériologiques sans rapports directs avec notre propre étude. Nous indiquerons seulement, dans chacun des 2 chapitres suivants, la bibliographie particulière aux microbes qui seront étudiés dans lesdits chapitres : bacillus subtilis et bacillus megatherium. Toutefois, nous dégagerons des données contradictoires fournies par l'ensemble de la littérature, les 2 conclusions suivantes :

- La destruction du butanediol et de l'acétoïne par les microbes est en partie sous la dépendance de l'espèce, voire même de la souche étudiée.

- La tendance actuelle est de considérer le butanediol et l'acétoïne comme des produits finaux de la glycolyse. Par exemple Stahly et Werkman (85) indiquent expressément que ces composés ne sont pas détruits par aerobacillus polymyxa; Neish et Coll. (2,60) semblent admettre qu'il en est de même avec bacillus subtilis puisqu'ils n'effectuent qu'un seul bilan des fermentations données par ce microbe, au lieu d'effectuer après disparition du glucose plusieurs bilans à quelques jours d'intervalle.

Les résultats que nous allons exposer, déjà résumés dans une brève note préliminaire (52), confirmeront au contraire la possibilité d'une destruction du butanediol et de l'acétoïne

CHAPITRE I

DESTRUCTION DU BUTANEDIOL ET DE L'ACÉTOÏNE

PAR UN MICROBE DU GROUPE DU BACILLUS SUBTILIS.

Les microbes du groupe du bacillus subtilis font subir aux glucides une fermentation butanediolique typique. Dans ce chapitre nous étudierons les facteurs qui influent sur la destruction, par un microbe de ce groupe, du butanediol et de l'acétoïne ainsi produits aux dépens du glucose par le microbe lui-même; c'est pourquoi nous serons amenés à envisager également la production préalable de ces composés aux dépens du glucose. On pourrait d'ailleurs étudier la destruction du butanediol et de l'acétoïne, à l'exclusion de leur production, en ensemençant le microbe dans un milieu synthétique contenant ces composés comme seuls aliments carbonés; cette étude fera l'objet d'une publication ultérieure.

La destruction par bacillus subtilis de l'acétoïne produite aux dépens du glucose par le microbe lui-même a été initialement démontrée par Péré (70); cet auteur suivait en fonction du temps la concentration dans les cultures microbiennes d'un composé lévogyre et réducteur qu'il croyait être l'aldéhyde glycérique, et qui, en fait, était l'acétoïne comme on le montra plus tard (29). Lemoigne (42) a confirmé cette destruction de l'acétoïne par b. subtilis, et a montré en outre que ce microbe produit et détruit également le butanediol. Williams et Morrow (103) ont conclu à la destruction de l'acétoïne par différents microbes dont b. subtilis. Dans les autres travaux consacrés à b. subtilis, et notamment dans les travaux récents (2, 60), la destruction du butanediol et de l'acétoïne n'est pas spécialement envisagée, et parfois semble même implicitement niée.

Nos études portent au contraire sur cette question; elles viennent confirmer et compléter les observations de Péré et Lemoigne en mettant en évidence 2 des facteurs qui influent sur la destruction du butanediol et de l'acétoïne par un microbe du groupe du b. subtilis. Ces facteurs sont :

1 - L'aération du milieu.

2 - Le rapport de la concentration du milieu en azote à sa concentration en glucose.

Nous cultivons le microbe dans un milieu synthétique contenant du glucose comme seul aliment carboné. Pour suivre la marche d'une

fermentation nous déterminons à intervalles réguliers le glucose, le butanediol, l'acétoïne, ainsi que le poids sec des corps microbiens qui atteint et dépasse parfois 20 % du glucose détruit. Sans doute, ces 4 déterminations ne permettent pas d'établir un bilan complet de la fermentation. Cependant, avant que débute la destruction du butanediol et de l'acétoïne, c'est-à-dire avant l'épuisement de glucose, la somme butanediol + acétoïne + poids sec des corps microbiens représente 30 à 35 % du glucose détruit. Par ailleurs, d'après les résultats de Neisch et Coll. (2,60), la destruction d'une molécule de glucose par b. subtilis donne en aérobiose 2 molécules au moins de gaz carbonique, de sorte que 50 % environ du glucose détruit se retrouve sous forme de CO_2 . On voit donc que le butanediol, l'acétoïne, les corps microbiens, le CO_2 qui se dégage, sont quantitativement les produits de beaucoup les plus importants de la glycolyse. Ceci explique que les déterminations, d'une part du glucose détruit, d'autre part du butanediol, de l'acétoïne et du poids sec des corps microbiens, nous aient suffi pour effectuer cette première étude sur la destruction du butanediol et de l'acétoïne par un microbe du groupe du b. subtilis.

La destruction du butanediol semble procéder ainsi : d'abord oxydation du butanediol en acétoïne, ensuite destruction de l'acétoïne. Par conséquent il n'y a pas lieu d'étudier séparément la destruction de chacun de ces composés; nous suivrons seulement leur destruction globale en faisant la somme de leur concentration, et en observant les variations de cette somme en fonction du temps.

1 - INFLUENCE DE L'AERATION DU MILIEU.

I - TECHNIQUE EXPERIMENTALE.

Nous utilisons le milieu synthétique suivant :

Glucose	35 g.
PO_4KH_2	5 g.
$\text{SO}_4 \text{ Mg, } 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,15 g.
$\text{SO}_4 \text{ Mn, } 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,03 g.
$\text{SO}_4 \text{ Fe, } 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,03 g.
NO_3K	10 g.
Soude N	25 cm ³
Eau de source q. s.	1.000 cm ³

Nous vérifions après stérilisation que le pH du milieu est égal à 6,8 - 7, s'il y a lieu nous ajustons le pH à cette valeur.

Nous ensemençons avec la souche B G₂ F₁ du service des fermentations de l'Institut Pasteur; nous avons choisi cette souche parce qu'elle est apte à se développer convenablement en milieu synthétique.

Pour étudier l'influence de l'aération nous faisons simplement varier la surface libre d'un volume donné de liquide en fermentation, en utilisant des récipients de forme ou de position différentes : nous répartissons le liquide ensemencé dans des boîtes de Roux ou dans des flacons d'Erlenmeyer de 500 cm³, stérilisés au préalable, à raison de 100 cm³ par récipient. Dans une étuve maintenue à 31°, nous posons les boîtes de Roux soit debout (milieu faiblement aéré) soit à plat (milieu moyennement aéré), et nous fixons les flacons d'Erlenmeyer sur un agitateur mécanique faisant par minute 30 oscillations de 20 cms d'amplitude environ (milieu fortement aéré).

Au bout d'un temps donné nous centrifugeons le contenu d'une boîte de Roux ou d'un flacon d'Erlenmeyer. Nous obtenons un culot microbien que nous lavons et desséchons à 100-110° pendant 24 h.; nous déterminons ainsi le poids sec des corps microbiens. Dans le liquide centrifugé nous dosons le butanediol et l'acétoïne par les méthodes précédemment décrites, et le glucose par la méthode de Bertrand.

Pour doser le glucose en présence d'acétoïne, il faut tenir compte du fait que ces composés sont tous les deux réducteurs. En partant d'acétoïne purifiée cristallisée (cf. p. 28), nous avons constaté que, dans les conditions opératoires de Bertrand, 1 mg. d'acétoïne correspond en moyenne à 0,427 cm³ de MnO₄K N/10 (tableau IV). Pour avoir la concentration effective du glucose dans une prise d'essai, il faut s'il y a lieu déduire de la quantité totale de MnO₄K versée la quantité de MnO₄K correspondant à l'acétoïne, avant de se reporter aux tables de Bertrand.

Tableau XV - RELATION ENTRE LE POIDS D'ACÉTOÏNE ET LE VOLUME
DE $MnO_4 K$ $N/10$, dans les conditions opératoires indiquées
par Bertrand pour le dosage du glucose

Poids d'acétoïne p (mg.)	Volume de $MnO_4 K$ $N/10$ v (cm ³)	$\frac{v(cm^3)}{p(mg.)}$
13,5	5,85	0,433
22,5	9,65	0,428
45	18,8	0,418
54	23,4	0,433
67,5	28,5	0,422

II - RESULTATS.

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau XVI. La figure 5 représente la variation en fonction du temps de la somme butanediol + acétoïne dans les boîtes de Roux posées debout et posées à plat; et dans les flacons d'Erlenmeyer agités. On voit sur le tableau XVI que dans le 1er cas la quantité initiale de glucose est de 3.560 mg. alors qu'elle est de 3.300 mg. dans les deux derniers; pour que les courbes correspondantes de la figure 5 soient cependant comparables entre elles, nous avons dans le 1er cas multiplié la somme butanediol + acétoïne par $\frac{3.300}{3.560}$ avant de la représenter graphiquement.

Nous exposerons d'abord les constatations ressortissant aux premières phases de la fermentation, antérieures à l'épuisement du glucose, et pendant lesquelles il y a production de butanediol et d'acétoïne sans qu'il y ait, apparemment, destruction de ces composés. Nous exposerons ensuite les constatations ressortissant aux dernières phases de la fermentation, postérieures à l'épuisement du glucose, et pendant lesquelles se manifeste la destruction du butanediol et de l'acétoïne.

A - Premières phases de la fermentation, antérieures à l'épuisement du glucose.

Plus l'aération du milieu est intense, plus la glycolyse est rapide : suivant que l'aération est faible, moyenne ou forte, la glycolyse s'effectue complètement en 10.4, ou 2 jours.

Plus l'aération du milieu est intense, plus forte est la production des corps microbiens, et plus faible celle du butanediol et de l'acétoïne : suivant que l'aération est faible, moyenne ou forte, les valeurs maxima trouvées sont, pour le poids sec des corps microbiens : 187,515 ou 543 mg. et pour la somme butanediol+acétoïne : 770,319 ou 124 mg. -(ce dernier chiffre est d'ailleurs un peu faible; il constitue un maximum expérimental, et non pas sans doute le maximum effectif : si nous avions fait plusieurs mesures entre le 2ème et le 3ème jour, nous aurions probablement trouvé un chiffre supérieur à 124). La figure fait nettement ressortir les différences considérables existant entre les variations de la somme butanediol + acétoïne pour chaque série d'expériences.

Par ailleurs la série d'expériences faite en milieu faiblement aéré montre que, tout au début de la glycolyse, pendant la phase expérimentielle de la croissance microbienne, la production de butanediol et d'acétoïne est faible : entre le 1er et le 2ème jour, pour 680 mg. de glucose détruit, le poids sec des corps microbiens est de 153 mg. tandis que la somme butanediol+acétoïne n'est que 54 mg. Ensuite la production des corps microbiens se ralentit tandis que la production de butanediol et d'acétoïne s'accélère : entre le 3ème et 4ème jour pour 1130-680 = 450 mg. de glucose détruit, le poids sec des corps microbiens n'augmente que de 7 mg. tandis que la somme butanediol + acétoïne passe de 54 à 153 mg., soit un gain de 99 mg.

Dans ces 2 derniers groupes de constatations, on voit une forte production de corps microbiens correspondre à une faible production de butanediol et d'acétoïne ou inversement; nous reviendrons sur cet aspect des résultats dans le paragraphe suivant.

B - Dernières phases de la fermentation, postérieures à l'épuisement du glucose.

Conformément aux observations de Péré (82) et Lemoigne (1), on constate dans chaque série d'expériences que le butanediol et l'acétoïne, produits pendant les premières phases de la fermentation, sont détruits partiellement ou complètement dans les dernières phases de celle-ci (fig. 5).

Toutefois comme il est indiqué ci-devant, en milieu faiblement aéré l'épuisement du glucose n'a lieu qu'au bout de 10 jours; ensuite seulement se manifeste la destruction du butanediol et de

Influence de l'aération du milieu

sur la production et la destruction du butanediol et de l'acétoïne
par un microbe du groupe du bacillus subtilis

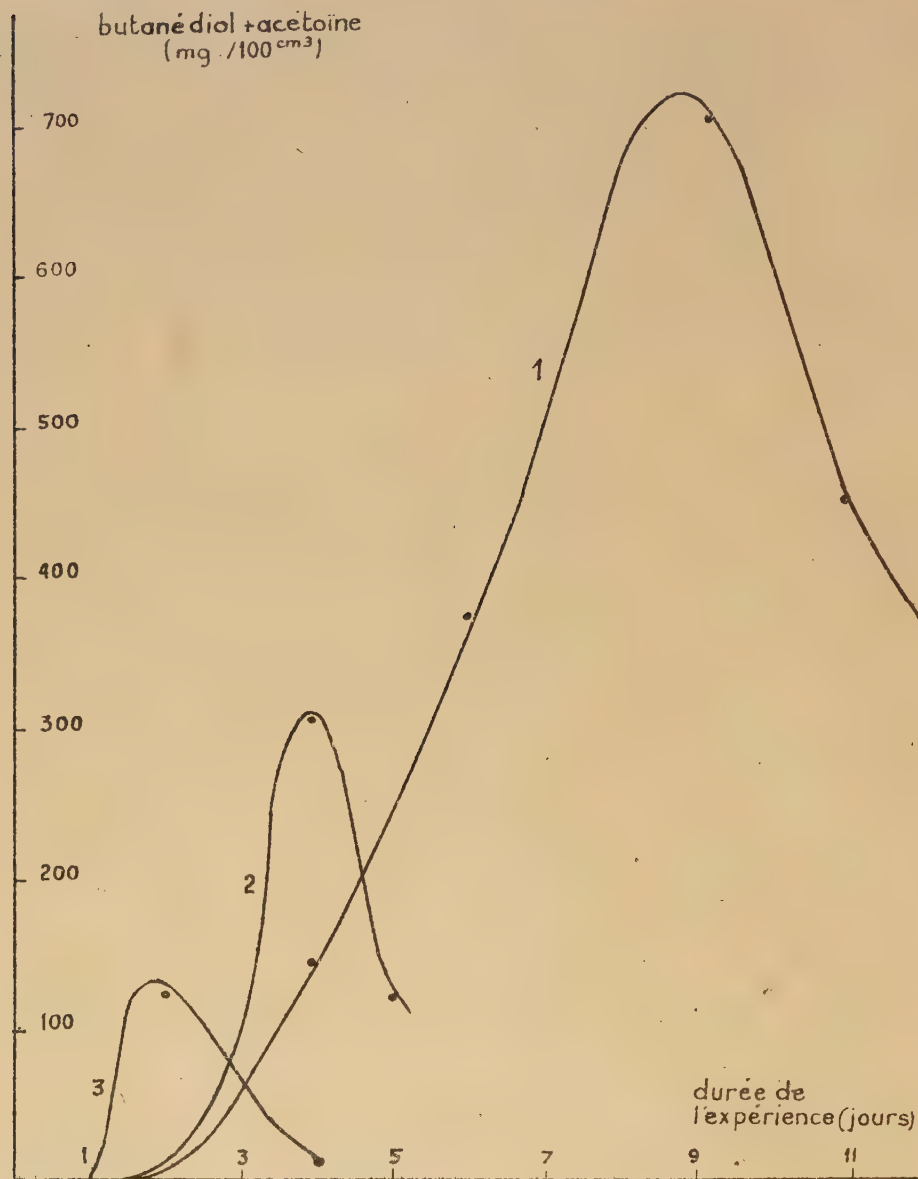


Figure 5

Courbe 1 - Milieu faiblement aéré (boîtes de Roux posées debout)
2 - - - moyennement - (- - - - - à plat)
3 - - - fortement - (flacons d'Erlenmeyer agités)

TABEAU XVI

Intensité de l'aération	Durée de l'expérience (jours)	Pour 100 cm ³ du milieu					
		Glucose (mg.)		Produits de la fermentation (mg)			
		restant	détruit	butane-diol	acétoïne	butane-diol + acétoïne	poids sec des corps microbiens
<u>faible</u> (Boîtes de Roux posées debout)	0	3.560					
	2	3.550					
	3	2.880	680	22	32	54	153
	4	2.430	1.130	56	97,5	153,5	160
	6	1.430	2.130	135	267	402	185
	7	890	2.670	137	394	531	187
	9	400	3.160	144	626	770	170
	11	0	3.560	0	448	448	185
	17	0	3.560	51	224	275	180
<u>moyenne</u> (boîtes de Roux posées à plat)	0	3.300					
	2	3.000	300	3,5	8,5	12	
	3	1.480	1.820	16,5	76,5	93	
	4	100	3.200	14	305	319	515
	5	0	3.300	11	101	122	294
<u>forte</u> (flacons d'Erlenmeyer agités)	0	3.300					
	1	3.300					
	2	0	3.300	29	95	124	543
	4	0	3.300	6	1	7	275

l'acétoïne qui est donc retardée mais non supprimée. Il est clair que si l'on n'avait pas suffisamment prolongé l'expérience on aurait pu abusivement nier cette destruction; c'est là une cause d'erreur qui explique semble-t-il certaines des contradictions de la littérature.

La destruction en question n'a d'ailleurs pas pour contrepartie une continuation de la croissance microbienne : le tableau XVI montre que pendant les dernières phases de la fermentation au cours desquelles cette destruction se manifeste, le poids sec des corps microbiens n'augmente plus ou même diminue fortement. Mais si cette destruction n'est pas liée à une croissance microbienne, peut-être joue-t-elle quelque autre rôle important, que nous ne pouvons pas encore actuellement préciser.

2. INFLUENCE DU RAPPORT DE LA CONCENTRATION DU MILIEU EN

AZOTE A SA CONCENTRATION EN GLUCOSE

Les résultats donnés dans le paragraphe précédent montrent, en particulier, que la forte production de corps microbiens provoquée par une aération du milieu suffisamment intense, correspond à une faible production de butanediol et d'acétoïne. Ceci nous a conduit à étudier comment varient la production, et la destruction consécutive du butanediol et de l'acétoïne, quand on agit sur la production des corps microbiens en faisant varier un autre facteur que l'aération du milieu. Nous avons choisi comme variable le rapport de la concentration initiale du milieu en azote à sa concentration en glucose. Ce rapport est effectivement un des facteurs de la production des corps microbiens; par exemple, dans un milieu relativement pauvre en azote, la production des corps microbiens sera relativement faible, puisque dans ce milieu les bactéries ne trouveront pas en quantité suffisante l'azote nécessaire à l'édification de leurs protéides.

I - TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Nous utilisons un milieu ayant la même composition et le même pH initial que celui du paragraphe précédent, hormis les 2 modifications suivantes :

nous adoptons une concentration initiale en glucose de 1.100 mg. pour 100 cm³ au lieu de 3.300 mg. pour 100 cm³, afin de diminuer la durée des différentes séries d'expériences;

comme aliment azoté nous choisissons au lieu de nitrate de potassium, du carbonate d'ammonium dans le but de rendre pratiquement nulle la variation du pH au cours de la fermentation.

Pour étudier l'influence du rapport de la concentration du

milieu en azote à sa concentration en glucose, nous laissons fixe la concentration initiale en glucose, et faisons varier la concentration initiale en carbonate d'ammonium d'une série d'expériences à l'autre.

Nous utilisons la même souche que dans le paragraphe précédent, et nous répartissons le milieu ensemencé dans des boîtes de Roux stérilisées au préalable à raison de 100 cm³ par boîte. Nous posons ces boîtes de Roux à plat, dans une étuve maintenue à 31°.

Comme précédemment (cf. p. 59) nous déterminons à intervalles réguliers le poids sec des microbes, le butanediol, l'acétoïne et le glucose. Nous déterminons en outre la quantité d'azote contenue dans le milieu, initialement sous forme de carbonate d'ammonium; pour cela nous dosons acidimétriquement l'ammoniac qui distille quand on porte à l'ébullition un volume connu du milieu initial alcalinisé.

II - RESULTATS

Nos résultats sont exprimés par le tableau XVII et la figure 6, qui sont analogues au tableau XVI et à la figure 5 du paragraphe précédent. Pour que les 4 courbes de la figure 6 soient comparables entre elles, nous avons dans le cas courbes 2 et 3 multiplié la somme Butanediol + acétoïne par $\frac{1100}{1040}$ et $\frac{1.100}{1.070}$ avant de les représenter graphiquement, tenant compte ainsi du fait que les concentrations initiales en glucose n'étaient pas exactement les mêmes dans les 4 séries d'expériences.

Pour exposer les constatations qui découlent de ces résultats, nous suivrons le même plan que dans le paragraphe précédent.

A - Premières phases de la fermentation, antérieures à l'épuisement du glucose.

Plus la concentration du milieu en azote est forte, plus le glycolyse est rapide : suivant que cette concentration, en mg. d'azote pour 100 cm³ du milieu est de 5.9, 14.6, 21.6 ou 69; la glycolyse s'effectue complètement en 7,3, ou moins de 2 jours.

Plus la concentration du milieu en azote est forte, et par suite plus la production des corps microbiens est forte, plus faible est la production de butanediol et d'acétoïne : suivant que cette concentration, en mg. d'azote pour 100 cm³ du milieu est de 5.9, 14.6, 21.6, ou 69, les valeurs maxima trouvées sont, pour le poids sec des corps microbiens 67, 127, 164 ou 236 mg, et pour la somme butanediol + acétoïne 313, 208, 180 ou 180 mg.

Par ailleurs, dans chaque série d'expériences, la produc-

Influence du rapport de la concentration du milieu en azote
à sa concentration en glucose

sur la production et la destruction du butanediol et de l'acétoïne
 par un microbe du groupe du bacillus subtilis.

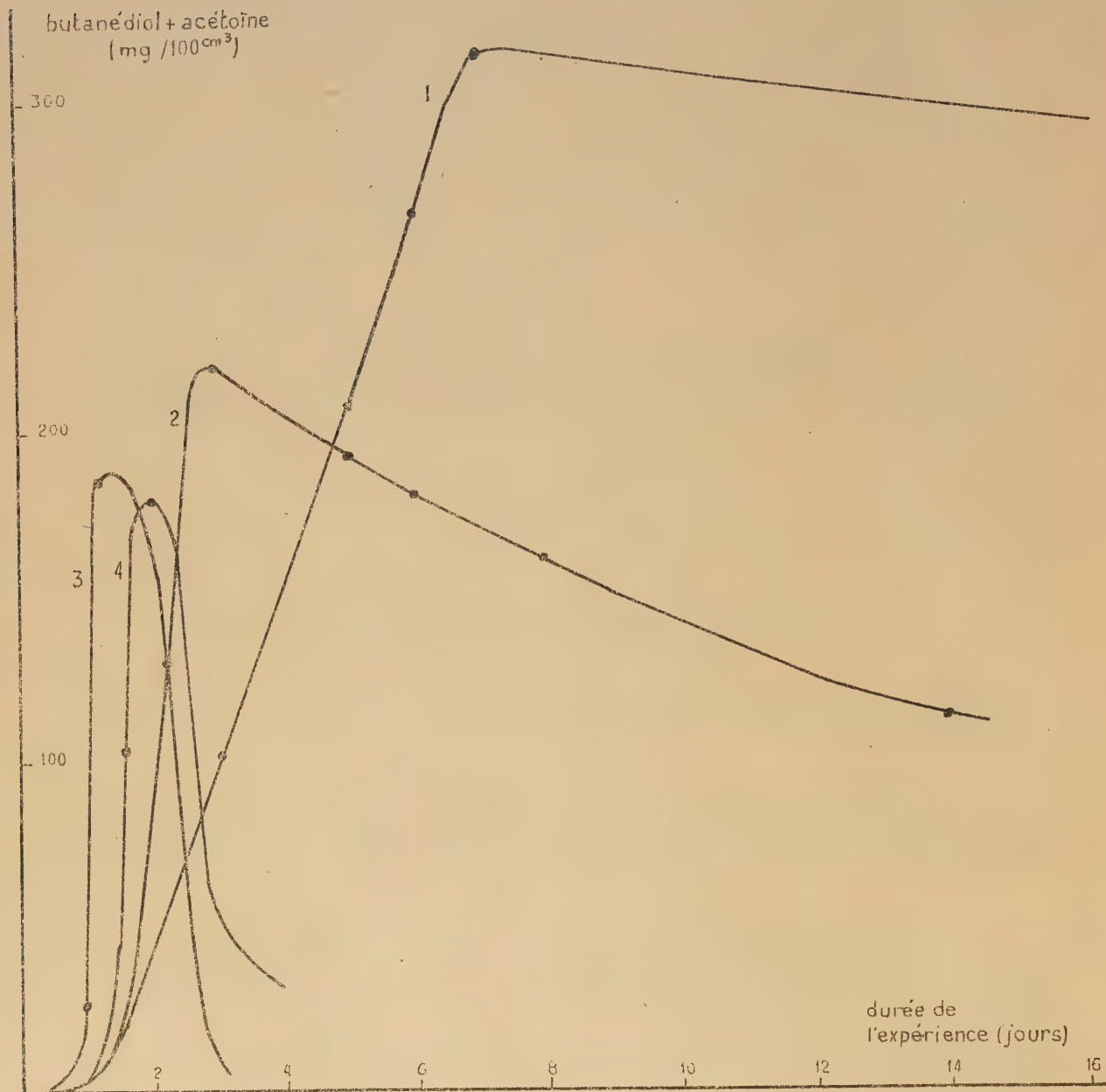


Figure 6

Courbe 1 - milieu contenant 5,9 mg. d'azote et 1.100 mg. de glucose
 pour 100 cm³

Courbe 2 -	id.	14,6	id.
Courbe 3 -	id.	21,6	id.
Courbe 4 -	id.	69	id.

TABLEAU XVII

Quantité d'azote dans 100 cm ³ du milieu (mg.)	Durée de l'expé- rience (jours)	Pour 100 cm ³ du milieu					
		Glucose (mg)		Produits de la fermentation (mg)			
		restant	détruit	butane- diol	acétof- ne	butane- diol + acétof- ne	poids sec des corps micro- biens
5,9	0	1100					
	1	920	180	1,4	2,4	3,8	58,5
	2	730	370	23	24	471	67
	3	500	600	73	30	103	61
	5	290	810	165	43	208	65
	6	165	935	209	57	266	58
	7	0	1100	198	115	313	
	16	0	1100	60	230	290	55,5
14,6	0	1040					
	1	865	175	0,65	1,1	1,75	
	2	470	570	42,5	33,5	76	127
	3	35	1005	73	135	208	70,5
	5	0	1040	3	178	181	66
	6	0	1040	0	169	169	
	8	0	1050	0	153	153	55
	14	0	1040	0	106,5	106,5	
21,6	0	1070					
	1	480	590	4,3	20	24,3	126
	1,25	0	1070	93	86	180	164
	2	0	1070	19	141	160	152
	2,25	0	1070	10	115	125	142
	3	0	1070	1	6	7	142
69	0	1100					
	1	940	160	0	3,4	3,4	
	1,6	280	820	22	81	103	221
	2	0	1100	20	160	180	236
	3	0	1100	0	50	50	219
	4	0	1100	0	30	30	194

tion de butanediol et d'acétoïne, faible pendant la phase exponentielle de la croissance microbienne, devient importante dès que cette phase est terminée.

Dans ces deux derniers groupes de constatations, on voit, comme dans le paragraphe précédent, où les conditions expérimentales étaient cependant différentes, une forte production de corps microbiens correspondre à une faible production de butanediol et d'acétoïne.

Nous ferons encore remarquer que dans la série d'expériences correspondant à la plus faible concentration en azote, la production du butanediol pendant les premières phases de la fermentation est nettement supérieure à la production d'acétoïne; c'est au contraire l'inverse qui a lieu pour les autres séries d'expériences de ce paragraphe et du paragraphe précédent. Nous ne pouvons pas pour le moment proposer une interprétation claire de ce fait.

B - Dernières phases de la fermentation postérieures à l'épuisement du glucose.-

Comme le montre le tableau XVII et plus particulièrement la figure 6, c'est seulement dans un milieu suffisamment riche en azote que la destruction du butanediol et de l'acétoïne est effective. Ainsi, dans la 1ère série d'expériences, correspondant à la plus faible concentration du milieu en azote, cette destruction est pratiquement supprimée. Il s'agit bien là d'une suppression de la destruction, et non d'un simple retard comme dans la 1ère série d'expériences du paragraphe précédent; on peut s'en convaincre en comparant les courbes qui traduisent les variations de la somme butanediol + acétoïne en fonction du temps (Fig. 5 courbe 1 et fig. 6 courbe 1) : en fin d'expérience, la première de ces courbes s'infléchit brutalement tandis que la seconde présente un pallier sensiblement horizontal. Dans le cas des milieux relativement pauvres en azote (5 mg. d'azote pour 1000 mg. de glucose dans 100 cm³ de milieu), le butanediol et l'acétoïne apparaissent ainsi comme des produits finaux de la glycolyse; au contraire dans des milieux plus riches en azote, ces composés sont détruits pendant les dernières phases de la fermentation. La destruction du butanediol et de l'acétoïne semble donc être en relation avec le métabolisme azoté.

Sur le rôle éventuellement joué par cette destruction nous pouvons présenter les mêmes observations que dans le paragraphe précédent (p. 64).

3. CONCLUSIONS

Ce chapitre est relatif à la production aux dépens du glucose, et à la destruction consécutive, du butanediol et de l'acétoïne par

CHAPITRE II

DESTRUCTION DU BUTANEDIOL & DE L'ACETOINE PAR BACILLUS MEGATHERIUM

Cultivé en milieu liquide agité, bacillus megatherium, fait subir aux glucides une fermentation caractérisée par la production abondante de lipide β hydroxybutyrique, qui s'accumule à l'intérieur des corps microbiens (49); au cours de cette fermentation le butanediol et l'acétoïne se forment également, mais seulement en très petites quantités (50 - cf. également p.46). Il n'y a donc pas lieu d'étudier la destruction du butanediol et de l'acétoïne produits aux dépens du glucose par le microbe lui-même, comme nous venons de le faire pour un microbe du groupe du bacillus subtilis. Mais il est possible d'étudier la destruction du butanediol introduit en quantités données dans un milieu de culture contenant ou non d'autres aliments carbonés; c'est ce que nous ferons.

D'ailleurs, comme le montre nos résultats, la destruction du butanediol procède, au moins en partie, de la façon suivante : d'abord oxydation du butanediol en acétoïne, ensuite destruction de l'acétoïne; de sorte qu'étudier la destruction du butanediol, c'est étudier également la destruction de l'acétoïne. Pratiquement, nous suivons seulement la destruction globale de ces composés en faisant la somme de leur concentration, et en observant les variations de cette somme en fonction du temps.

Le fait de la destruction du butanediol et de l'acétoïne par b. mégatherium, et particulièrement le fait que ce microbe donne des cultures abondantes dans un milieu synthétique contenant du butanediol comme seul aliment carboné, n'avaient pas encore été établis jusqu'ici. Nous mettons ces faits en évidence en étudiant comparativement les cultures données par b. megatherium aux dépens soit du glucose seul, soit du mélange glucose-butanediol, soit du butanediol seul; dans chaque série d'expériences nous déterminons à intervalles réguliers le glucose, le butanediol, l'acétoïne et le poids sec des corps microbiens.

I - TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Nous utilisons un milieu de culture synthétique ayant la même composition minérale que le milieu décrit p. 58, mais additionné de soude en quantité telle que son pH initial soit égal à 6,1 - 6,3. En outre, pour 100 cm³ ce milieu contient : dans l'expérience 1, 2.394 mg. de glucose; dans l'expérience 2 - 2.394 mg. de glucose

et 750 mg. de butanediol; dans l'expérience 3 - 1.515 mg. de butanediol.

Nous nous sommes servis du butanediol fourni par la firme hollandaise "N.V. Nederlandsche Gist en Spiritus Fabriek"; ce produit optiquement inactif, purifié par 2 distillations successives, avait pour point d'ébullition 178° et pour point de fusion 27° environ. D'après Wilson et Lucas (95) ces constantes sont pour l'isomère inactif : 182° et 34°,5 pour le mélange de quantités égales des isomères dextrogyre et lévogyre : 177° et 8°. Le produit que nous utilisons pourrait donc être un mélange de ces 3 isomères, spécialement riche en l'isomère inactif; ce n'est d'ailleurs là qu'une présomption. Quoiqu'il en soit, dans nos expériences, ce produit a été presque complètement détruit par b. megatherium.

Nous ensemençons le milieu stérilisé avec une souche de b. megatherium entretenue depuis un certain temps par repiquages successifs sur bouillon de haricots gélosé. Cette souche avait des propriétés légèrement différentes de celles que présentent en général les souches fraîchement isolées du sol : elle donnait des proportions moindres de lipide β hydroxybutyrique et d'acétoïne, et sporulait plus facilement.

Nous répartissons le milieu ensemencé dans des flacons d'Erlenmeyer de 1000 cm³ stérilisés au préalable, à raison de 100 cm³ par flacon. Dans une étuve maintenue à 31°, nous fixons ces flacons sur un agitateur mécanique faisant par minute 30 oscillations de 20 cm. d'amplitude environ.

Comme dans le chapitre précédent (cf. p. 59) nous déterminons à intervalles réguliers le glucose, le butanediol, l'acétoïne et le poids sec des corps microbiens.

II - RESULTATS & CONCLUSIONS

L'ensemble de nos résultats, relatifs aux expériences 1, 2, et 3, est donné par le tableau XVIII; la figure 7 se rapporte spécialement à l'expérience 2.

...../.....

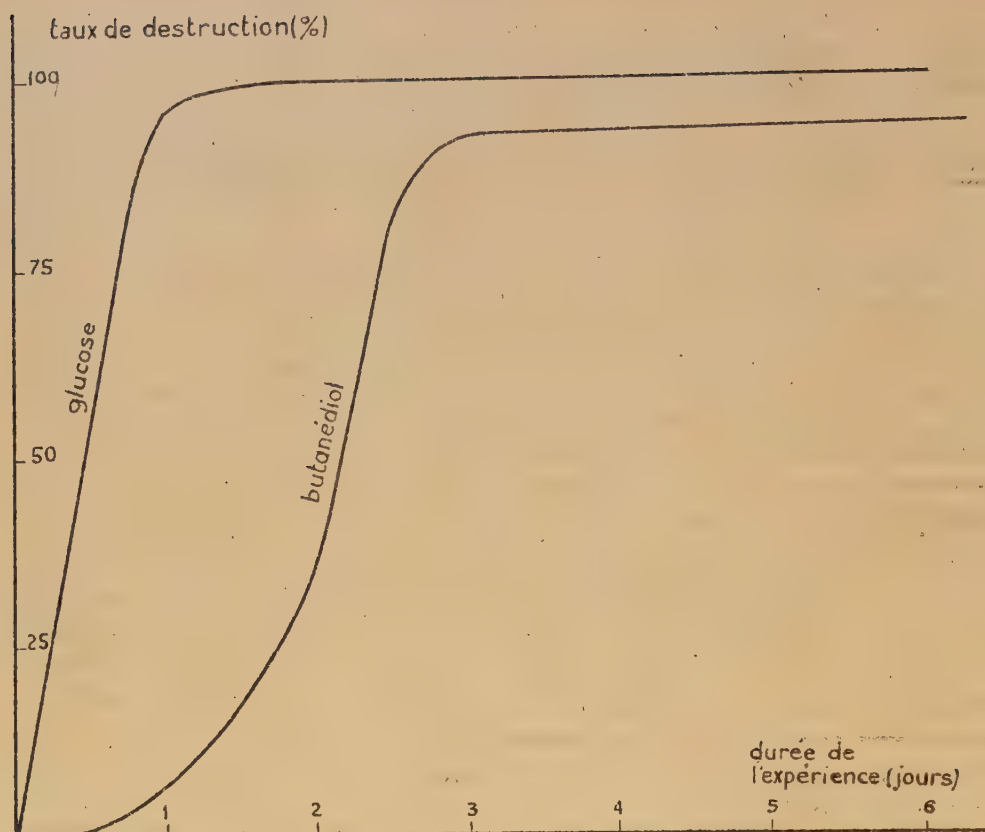


Figure 7

Destruction du glucose et du butanediol par *b. megatherium*.

expérience 2 - cf. Tableau XVIII

quantité initiale de glucose 2.394 mg. pour 100 cm³ de milieu

- - - butanediol 750 - - -

Les conclusions qui se dégagent de ces résultats sont les suivantes :

La phase de latence est plus longue quand le milieu contient du butanediol (expérience 3) que quand il contient du glucose (expérience 1). Ceci explique en partie que dans un milieu contenant à la fois glucose et butanediol, le glucose soit détruit avant le butanediol (expérience 2 - cf. fig. 7). Cependant si la destruction du butanediol est relativement lente, elle n'en est pas moins quasi-intégrale : dans l'expérience 2, sur 750 mg. de butanediol initial

TABEAU XVIII

DESTRUCTION DU BUTANEDIOL ET DE L'ACETOINE par BACILLUS MEGATHERIUM

N° de l'expérience	Durée de l'expérience	Pour 100 cm ³ du milieu, en mg :					Poids secs des corps microbiens
		Glucose	Butane-diol	Acétoïne	Butanediol+Acétoïne Restant	Détruit	
	jours						
	0	2.394	0	0			
	1	80	0	+			596
	2	0	0	+			375
	3	0	0	0			364
	6	0	0	0			427
	0	2.394	750	0	750		
	1	90	684	17	701	49	701
	2	0	477	17	494	256	540
	3	0	46	+	46	704	694
	6	0	40	0	40	710	581
	0	0	1.515	0	1.515		
	1	0	1.425	24	1.449	66	
	3	0	770	31	801	714	311
	5	0	104	0	104	1.411	517

(pour 100 cm³ de milieu), 704 mg. sont détruits en 3 jours; dans l'expérience 3, sur 1.515 mg. de butanediol initial (pour 100 cm³ de milieu), 714 mg. sont détruits en 3 jours, et 1.411 mg. en 5 jours.

L'expérience 3 montre que b. megatherium donne des cultures abondantes dans un milieu synthétique contenant du butanediol comme seul aliment carboné. La production de corps microbiens dans ces conditions est d'ailleurs remarquablement grande : le rapport du poids des corps microbiens formés au poids du butanediol détruit est, après 3 jours de $\frac{311}{714} = 43,5$ et après 5 jours de $\frac{517}{1.411} = 36,6$. A titre de com-

paraison, nous faisons remarquer que l'expérience 1 (milieu à base de glucose), le rapport du poids des corps microbiens formés au poids du glucose détruit est seulement de $\frac{596}{2.314} = 25,8$ après 1 jour, et qu'il

ne peut que diminuer ensuite. Nous reviendrons sur cette constatation importante dans un travail ultérieur.

Dans l'expérience 3, où le milieu contient du butanediol comme seul aliment carboné, la destruction du butanediol a visiblement pour contrepartie une synthèse de corps microbiens; il faudrait d'ailleurs dans ce cas parler de l'assimilation du butanediol plutôt que de sa destruction. Dans l'expérience 2, où le milieu contient à la fois glucose et butanediol, la destruction du butanediol semble également correspondre à une synthèse de corps microbiens : le poids sec de ceux-ci est en effet plus grand dans cette expérience que dans l'expérience 1 où le milieu est identique, sauf qu'il ne contient pas de butanediol; là également il faudrait parler de l'assimilation du butanediol. On peut donc dire que le butanediol est tout autant que le glucose un aliment carboné assimilable par b. megatherium.

Il reste, en particulier, à préciser le mécanisme de cette assimilation du butanediol (et de l'acétoïne) par b. megatherium, comme dans le chapitre précédent il restait à déterminer la signification de la destruction de ces composés par un microbe du groupe du b. subtilis; dans ce travail en effet, nous avons seulement cherché à montrer que ces phénomènes avaient lieu, et qu'ils étaient d'une netteté remarquable.

CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE

Dans un premier chapitre nous avons étudié la production aux dépens du glucose, et la destruction consécutive, du butanediol et de l'acétoïne par un microbe du groupe du bacillus subtilis; dans un deuxième chapitre nous avons montré que le butanediol est tout autant que le glucose un aliment carboné assimilable par bacillus megatherium. Pour l'exposition détaillée de ces faits et de leurs conclusions premières nous renvoyons aux chapitres eux-mêmes; nous essaierons ici de situer ces faits et conclusions par rapport aux faits déjà connus et aux théories actuelles sur le métabolisme intermédiaire, afin de reconnaître les directions dans lesquelles ces recherches devront se poursuivre.

Nous avons attiré l'attention sur la destruction du butanediol et de l'acétoïne par certains microbes, destruction qui dans le cas de b. megatherium est en fait une véritable assimilation. Ce phénomène de destruction, nullement particulier aux microbes, se manifeste aussi chez les organismes supérieurs : Neuberg et Gottschalk (62) expérimentant sur des lapins, concluent à la transformation ou à l'assimilation du butanediol et de l'acétoïne; Westerfeld et Berg (101) donnent à un chien par voie buccale ou sous-cutanée jusqu'à 26 g. de ces composés et n'en retrouvent que 5 à 25 % dans les urines, le reste étant très certainement métabolisé; Greenberg (23) constate la disparition rapide de l'acétoïne dans le sang de chiens ayant reçu préalablement une certaine dose de ce composé.

Pourtant jusqu'ici aucune théorie n'a été proposée pour rendre compte de la destruction du butanediol et de l'acétoïne; en particulier le cycle classique de l'acide citrique suivant lequel s'effectuerait le catabolisme glucidique, ne fait aucune place explicite à la formation et à la destruction (ou l'assimilation) de ces composés. Il y a donc là une lacune importante qu'il conviendrait de combler.

Le fait que le butanediol est tout autant que le glucose un aliment carboné assimilable par b. megatherium nous avait d'abord suggéré que ce composé pouvait dans certains cas être substitué au glucose, et nous étions tentés d'identifier son catabolisme à celui des glucides.

Cependant, nous l'avons vu, la destruction du butanediol commence vraisemblablement par une oxydation en acétoïne; on peut légitimement supposer que ce dernier composé, étant donné sa formule,

conduit en aérobiose à l'acide acétique. Cette hypothèse n'est pas la seule possible mais semble la plus probable; elle s'appuie sur les travaux de Herman et Neuschul (30), de Tomiyasu (96), qui ont montré que l'acétoïne était transformée en acide acétique par différents microorganismes; en outre, elle est en accord avec les résultats de Westerfeld et Doisy (17), suivant lesquels l'acétoïne favorise notablement l'acétylation de l'acide p-aminobenzoïque par les organismes supérieurs. Quant à l'acide acétique, on sait qu'il peut donner de l'acide acétylacétique (7), lequel est un des "composés cétoniques" dérivant ordinairement du catabolisme lipidique. Le catabolisme du butanediol serait donc à rapprocher de celui des lipides, et non des glucides. Autrement dit, le butanediol serait un composé "cétogène" qui loin de pouvoir remplacer les glucides exigerait au contraire, pour sa complète destruction par les organismes supérieurs, l'addition de glucides, ou plus précisément d'acide oxalacétique d'après une théorie présentée par Breusch dans une publication très récente (7). Nous nous proposons d'étudier ultérieurement la validité de ces hypothèses.

Il reste que b. megatherium donne des cultures abondantes dans un milieu synthétique contenant du butanediol comme seul aliment carboné, et dans ce cas, la production de "composés cétoniques", pour réelle qu'elle soit (b. megatherium produit à partir du butanediol, comme d'ailleurs à partir du glucose, des quantités importantes de lipide β hydroxybutyrique qui s'accumulent dans les corps microbiens), ne saurait être le seul mode de transformation du butanediol. Il faut bien en effet qu'une partie du butanediol fournisse l'énergie et le carbone nécessaires à la synthèse des composés constitutifs des corps microbiens, autres que le lipide β hydroxybutyrique lui-même. Pour cela, au lieu de conduire aux "composés cétoniques", ordinairement inassimilables en l'absence de glucose, le butanediol doit sans doute s'intégrer dans un certain cycle de réactions qui remplace, ou tout au moins complète, le cycle classique de l'acide citrique; ce dernier cycle ne fait en effet aucune place explicite à l'assimilation du butanediol, ainsi que nous l'avons déjà dit. Par conséquent si, dans certains cas, la destruction du butanediol correspond à une production de "composés cétoniques", elle doit dans d'autres cas s'effectuer d'une toute autre manière, laquelle demeure entièrement à élucider. Nous poursuivons actuellement l'étude de cette question.

En résumé, la destruction du butanediol et de l'acétoïne par les organismes est un phénomène assez général et particulièrement net, dont le mécanisme est encore inconnu; nous avons étudié certains des aspects pris par ce phénomène dans le cas des microorganismes, et nous avons formulé au sujet de son mécanisme quelques hypothèses qui s'opposent partiellement les unes aux autres, et sont actuellement soumises à l'expérience.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I - Les composés caractéristiques de la fermentation butanediolique sont le 2-3 butanediol $\text{CH}_3\text{-CHOH-CHOH-CH}_3$, l'acétoïne $\text{CH}_3\text{-CHOH-CO-CH}_3$ et le diacétyl $\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$; le dosage de chacun de ces composés peut se ramener à un dosage de diméthylglyoxime. Pour effectuer ce dernier dosage, au lieu d'utiliser le précipité rose insoluble donné par le diméthylglyoxime avec Ni(II) (comme dans les méthodes classiques qui sont longues et peu sensibles), nous utilisons le complexe rouge soluble donné par le diméthylglyoxime avec Ni(IV). Nous établissons ainsi 4 méthodes colorimétriques qui respectivement permettent :

1°) De doser en 5 minutes, à 1 % près, 120 à 600 μg de diméthylglyoxime dans une prise d'essai de 10 cm^3 .

2°) De doser en 30 minutes, à 1 % près, 90 à 450 μg de diacétyl dans une prise d'essai de 10, 50 ou 100 cm^3 .

3°) De doser en 50 minutes, à 1 % près, 90 à 450 μg d'acétoïne dans une prise d'essai de 10, 50 ou 100 cm^3 .

4°) De doser en 70 minutes, à 3 % près, 100 à 500 μg de butanediol dans une prise d'essai de 10 cc .

Ces méthodes fondées sur des réactions spécifiques des composés à doser (contrairement aux nombreuses méthodes proposées récemment pour le dosage du butanediol) demeurent applicables quand ces composés sont accompagnés par des quantités 1.000 fois supérieures de substances diverses telles que, par exemple, le glucose, le glycérol.

II - Nous avons recherché et dosé l'acétoïne et le butanediol dans certains milieux de fermentation alcoolique, afin de comparer nos méthodes analytiques avec les méthodes récemment proposées par Peynaud pour l'étude de ces milieux. Nos méthodes sont sensiblement équivalentes à celles de Peynaud quant aux chiffres qu'elles donnent, mais sont beaucoup plus rapides et sensibles.

III - Les milieux fermentés par Bacillus cereus et Bacillus

megatherium contiennent des petites quantités de butanediol, généralement inférieures à 50 mg./l. Ces résultats, obtenus par nos nouvelles méthodes analytiques, n'auraient pu s'établir à l'aide des nombreuses méthodes récemment proposées pour le dosage du butanediol, qui sont moins spécifiques et sensibles.

IV - Des suspensions lavées de bacillus subtilis transforment l'acide pyruvique en acétone lévogyre, avec production concomitante de gaz carbonique; les bactéries provenant d'une culture jeune sont à cet égard plus actives que celles provenant d'une culture vieille; la quantité d'acétone formée peut atteindre 100 % de la quantité théorique, calculée d'après l'équation : $2 \text{ CH}_3\text{-CO-COOH} \longrightarrow \text{CH}_3\text{-CHOH-CO-CH}_3 + 2 \text{ CO}_2$

V - Bacillus subtilis fait subir aux glucides une fermentation butanediolique typiques; si au cours de la glycolyse la production de corps microbiens est faible pour des raisons diverses (milieu faiblement aéré, ou pauvre en azote; phase exponentielle de la croissance microbienne terminée), la production du butanediol et de l'acétone est forte, ou inversement.

Le butanediol et l'acétone produits au cours de la glycolyse sont ensuite généralement détruits. Si le milieu est faiblement aéré, la vitesse de la glycolyse est réduite, et cette destruction est retardée mais non supprimée; si le milieu est pauvre en azote, la vitesse de la glycolyse est également réduite, et cette destruction est pratiquement supprimée au lieu d'être simplement retardée. Cette destruction semble donc être en relation avec le métabolisme azoté.

VI - Bacillus megatherium, qui fait subir aux glucides une fermentation β hydroxybutyrique, donne aussi des cultures abondantes dans un milieu synthétique contenant du butanediol comme seul aliment carboné. Dans ce cas, la phase de latence est un peu plus longue que pour des cultures faites sur glucose, mais pendant la phase exponentielle de la croissance, le rapport du poids des corps microbiens formés au poids du butanediol détruit est remarquablement élevé. Le butanediol est donc, tout autant que le glucose, un aliment carboné assimilable par bacillus megatherium.

De ces différentes études, que nous poursuivons actuellement, doivent finalement se dégager la signification physiologique et le mécanisme de la fermentation butanediolique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ADAMS, G.A., NEISH, A.C., STANIER, R.Y., etc...
"Production and properties of 2-3 butanediol" - voir une quinzaine d'articles publiés sous ce titre général dans - Can. J. Res., 1945-46-47, 23-23 B-2, F-25 F.
- 2 - HARNICOAT, C.R.
"Analyst", 1935, 60, 653 662.
- 3 - BARRIT, M.M.
"The intensification of the Voges - Proskauer reaction by the addition of α naphthol" - J. of Path. and Bact., 1936, 42, 441-454.
- 4 - BLACWOOD, A.C., NEISH, A.C., BROWN, W.E., et LEDINGHAM, G.A.
"Fermentation of glucose by strains of bacillus subtilis" - Can. J. Res., 1947, 25B, 56-64.
- 5 - BLOM, R.H., REED, D.L., EFRON, A., et MUSTAKAS, G.C.
"Recovery of 2-3 butyleneglycol from fermentation liquors" - Ind. Eng. Chem., 1945, 37, 865-870.
- 6 - BOUVEAULT, L., et LOCQUIN, R.
"Action du sodium sur les éthers-sels des acides gras - Préparation des acyloïnes du type R-CO-CHOH-R (nomenclature adoptée)" - Bull. Soc. Chim., 1906, 35(13), 632.
- 7 - BREUSCH, F.L.
"The biochemistry of fatty acid catabolism" - Advances in Enzymology" 1948, 8, 343-423.
- 8 - BRIOUX, C et JOUIS, E.
"Le diacétyle dans les beurres normands" - C. r. Ac. Sc., 1937, 205, 526.

- 9 - BROCKMANN, M.C., et WERKMAN, C.H.
"Determination of 2-3 butyleneglycol in fermentations" -
Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 1933, 5, 206.
- 10 - CHARLOT, G.
"L'iode et ses dérivés, indicateur d'oxydo-réduction"
Bull. Soc. Chim., 1941, 8(5), 222-228.
- 11 - CIAMICIAN, G., et SILBER, P.
"Chemische Lichtwirkungen"
Ber., 1911, 44, 1285.
- 12 - DENTICE DI ACCADIA, F.
"Production d'acétylméthylcarbinol et de 2-3 butylèneglycol
par bacillus cereus" - Ann. Inst. Pasteur, 1947, 73, 114.
- 13 - DESMOTS, H.
"Production de l'acétylméthylcarbinol par les bactéries du
groupes du bacillus mesentericus" - C. r. Ac. Sc., 1904, 138,
581.
- 14 - DIEHL, H.
"The chelate rings" - Chem. Rev., 1937, 21, 39-111.
- 15 - DIEMAIR, W. et KIEBER, J.
"Beitrag zur Kenntnis der Bildung von Acetylméthylcarbinol
und 2-3 Butylenglykol bei der Gärung" - Z. Unt. Lebensm.,
1941, 81, 385-404.
- 16 - DIRSCHERL, W.
"Die Bildung von Acetoin aus Acetaldehyd und aus Brenztrauben-
saure durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht" - Z. Physiol.
Chem., 1930, 188, 225-246.
- 17 - DOISY, E.A., et WESTERFELD, W.W.
"The relationship of acetoin to metabolic acetylations" -
J. Biol. Chem., 1943, 149, 229-236.

- 18 - DONKER, H.J.L.
"Thèse", Delft, 1926.
- 19 - EGGLETON, P., ELSDEN, S.R., et GOUGH, N.
"The estimation of creatine and of diacetyl" - Bioch. J., 1943, 37, 526-529.
- 20 - FEIGL, F.
"Ueber Verbindungen des vierwertigen Nickels mit Dimethylglyoxim, sowie über einen empfindlichen Nickel Nachweis" - Ber., 1924, 57, 758-761.
- 21 - FRANKE, W.
"Die Enzyme der Desmolyse" - dans NORD-WEIDENHAGEN - Handbuch der Enzymologie - Leipzig (1940), Tome II, 779-782.
- 22 - GREEN, D.E., WESTERFELD, W.W., VENNESLAND, B., et KNOX, W.E.
"Carboxylases of animal tissues" - J. Biol. Chem., 1942, 145, 69-84.
- 23 - GREENBERG, L.A.
"Acetoin : polarographic determination and disappearance from the blood after administration" - J. Biol. Chem., 1943, 147, 11,17.
- 24 - GRIMBERT, L.
"Production d'acétylméthylcarbinol par le bacillus tartricus" C. r. Ac. Sc., 1901, 132, 706.
- 25 - GUITTONNEAU, M.G., BEJAMBES, M., et TAVERNIER, J.
"Sur la présence et l'origine de l'acétylméthylcarbinol et du 2-3 butanediol dans les cidres normands - les aerobacter en cidrerie" - Ann. Ferm., 1941, 6, 159-167.
- 26 - HARDEN, A. et WALPOLE, G.S.
"Chemical action of B. lactis aerogenes (Escherich) on glucose

and mannitol. Production of 2-3 butyleneglycol and acetylmethylcarbinol" - Proc. Roy. Soc. London, 1906, 77B, 399-405.

27 - HARDEN, A. et NORRIS, D.

"The diacetyl reaction for proteins" - J. of Physiol., 1911, 42, 332-336.

28 - HARDEN, A. et NORRIS, D.

"The bacterial production of acetylmethylcarbinol and 2-3 butyleneglycol from various substances" - Proc. Roy. Soc. London, 1912, 84B, 492-499.

29 - HARDEN, A. et NORRIS, D.

"The bacterial production of acetylmethylcarbinol and 2-3 butyleneglycol from various substances (II)" - Proc. Roy. Soc. London, 1912, 85B, 73-78.

30 - HERMANN, S. et NEUSCHUL, P.

"Milchsäure und Brenztraubensäure - Abbau durch Essigbakterien" - Biech. Z., 1932, 246, 446-459.

31 - HOOREMAN, M.

"Microdosage de l'acétylméthylcarbinol dans les jus fermentés" - C. r. Ac. Sc., 1946, 222, 1257.

32 - HOOREMAN, M.

"Microdosage du 2-3 butyléneglycol" - C. r. Ac. Sc., 1947, 225, 208.

33 - JOHLIN, J.M.

"A method for the separation and identification of certain homologous diketones" - J. Am. Chem. Soc., 1915, 37, 892-896.

34 - JOHNSON, M.J.

"Determination of 2-3 butylene glycol in fermentations" - Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 1944, 16, 626.

- 35 - JOHNSON, M.J., PETERSON, W.H., et FRED, E.B.
"Intermediary compounds in the acetonebutyl alcohol fermentation"
- J. Biol. Chem., 1933, 101, 145-157.
- 36 - KATZNELSON, H.
"Studies with *b. polymyxa*" - voir 5 articles publiés sous
ce titre général dans - Can. J. Res., 1944 - 46 - 47, 22C -
24C - 25C.
- 37 - KLUYVER, A.J., DONKER, L., et VISSER'T HOOFT
"Ueber die Bildung von Acetylmethylcarbinol und 2-3 Butylenglycol im Stoffwechsel der Hefe" - Bioch. Z., 1925, 161, 361-378.
- 38 - KOOI, E.R., FULMER, E.I., et UNDERKOPFLER, L.A.
"Production of 2-3 butanediol by fermentation of cornstarch" -
Ind. Eng. Chem., 1948, 40, 1440-1445.
- 39 - KNIPHORST, L.C.E., et KRUISHEER, C.I.
"Die Bestimmung von 2-3 Butylenglykol, Acetylmethylcarbinol
und Diacetyl in Wein und anderen Gärungs-produkten" - Z. Unt.
Lebensm., 1937, 73, 1-19.
- 40 - LAFON, M.
"Sur l'origine possible de l'acétylméthylcarbinol dans la
dégradation du saccharose par bacillus subtilis" - Bull.
Soc. Chim. Biol., 1932, 14, 263-271.
- 41 - LANGLYKKE, A.F. et PETERSON, W.H.
"Determination of acetylmethylcarbinol" - Ind. Eng. Chem., Anal.
Ed., 1937, 9, 163.
- 42 - LEMOIGNE, M.
"Assimilation du saccharose par les bactéries du groupe du
'*b. subtilis*'. Fermentation butylénéglycolique" - Ann. Inst.
Pasteur, 1913, 27, 856-885.
- 43 - LEMOIGNE, M.
"Fermentation butylénéglycolique du glucose par les staphylo-
coques et les tétragones" - C. r. Ac. Sc., 1913, 157, 653.

44 - LEMOIGNE, M.

"Fermentation butylèneglycolique du saccharose par les bactéries du groupe du bacillus prodigiosus" - C. r. Soc. Biol., 1919, 82, 234.

45 - LEMOIGNE, M.

"Fermentation butylèneglycolique des sucres par la bactérie charbonneuse (bacillus anthracis)" - C. r. Soc. Biol., 1919, 82, 984.

46 - LEMOIGNE, M.

"Réaction spécifique du 2-3 butylèneglycol et de l'acétylméthylcarbinol, produits de la fermentation butylèneglycolique" - C. r. Ac. Sc., 1920, 170, 131.

47 - LEMOIGNE, M.

"Fermentation butylèneglycolique des hydrates de carbone par les vibrions cholériques et pseudocholériques, et par les bacilles diphtériques et pseudodiphtériques" - C. r. Soc. Biol., 1920, 82, 336.

48 - LEMOIGNE, M.

"Fermentation butylèneglycolique du glucose par certaines bactéries du groupe du bacillus proteus" - C. r. Soc. Biol., 1923, 88, 467.

49 - LEMOIGNE, M.

"La fermentation β hydroxybutyrique" - Helv. Chim. Acta, 1945, 29, 1303.

50 - LEMOIGNE, M., et CROSON, M.

"Production simultanée d'acétylméthylcarbinol et de lipide β hydroxybutyrique" - Bull. Soc. Chim. Biol., 1946, 28, 110-114.

51 - LEMOIGNE, M., DELAPORTE, B., et CROSON, M.

"Contribution à l'étude botanique et biochimique des bactéries du genre bacillus - Valeur du test de l'acétylméthylcarbinol

pour la caractérisation des espèces" - Ann. Inst. Pasteur, 1944, 70, 65-79.

52 - LEMOIGNE, M., et KOOREMAN M.

"Sur l'assimilation du 2-3 butanediol et de l'acétoïne par les bactéries" - C. r. Ac. Sc., 1948, 227, 159.

53 - LEMOIGNE, M., et MONGUILLON, P.

"Présence de l'acétylméthylcarbinol et du 2-3 butyléneglycol chez les plantes supérieures. Formation au cours de la germination" - C. r. Ac. Soc., 1930, 190, 1457.

54 - LEMOIGNE, M., et MONGUILLON, P.

"Présence de l'acétylméthylcarbinol et du 2-3 butyléneglycol dans le sang des animaux supérieurs" - C. r. Ac. Sc., 1930, 191, 80.

55 - LESLIE, J.D. et CASTAGNE, A.

"Production and properties of 2-3 butanediol - Butanediol analyses for process. control" - Can. J. Res., 1946, 24F, 311-319.

56 - MATIGNON, C.; MOUREU, H., et DODE, M.

"Sur le dosage du butanediol 2-3" - Bull. Soc. Chim., 1934, 1(5), 411-419.

57 - MAZE, P.

"Recherches sur l'assimilation du gaz carbonique par les plantes vertes" - C. r. Ac. Sc., 1920, 171, 1391.

58 - MEUNIER, P.

"Un électrophotomètre à cellules à couche d'arrêt destiné à l'opacimétrie pratique" - C. r. Ac. Sc., 1935, 201, 1371.

59 - MURRAY, W.M. et ASHLEY, S.E.Q.

"Determination of manganese, nickel and phosphorous in iron and steel" - Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 1938, 10, 1-5.

- 60 - NEISH, A.C., BLACWOOD, A.C. et LEDINGHAM, G.A.
"Dissimilation of glucose by bacillus subtilis (Ford's strain)"
- Can. J. Res., 145, 23B, 290-296.
- 61 - NEISH, A.C., BLACWOOD, A.C., ROBERTSON, F.M. et LEDINGHAM, G.A.
"Dissimilation of glucose by bacteria of the genus serratia" -
Can. J. Res., 1943, 26B, 335-342.
- 62 - NEUBERG, C. et GOTTSCHALK, A.
"Über das physiologische Verhalten des Acetoin - Über das
Verhalten des Acetoin im Tierkörper" - Bioch. Z., 1925, 162,
483-487. .
- 63 - VAN NIEL, C.B.
"Notiz über die quantitative Bestimmung von Diacetyl und
Acetylmethylcarbinol" - Bioch. Z. 1927, 187, 472-478.
- 64 - VAN NIEL, C.B., KLUYVER, A.J. et DERX, H.G.
"Über das Butteraroma" - Bioch. Z., 1929, 210, 246.
- 65 - OLSON, B.H. et JOHNSON, M.H.
"The production of 2-3 butyleneglycol by aerobacter aerogenes"
- J. of Bact., 1948, 55, 209-222.
- 66 - O'MEARA, R.A.Q.
"A simple delicate and rapid method of detecting the formation
of acetylmethylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrate"
- J. of Path. and Bact., 1931, 34, 401-406.
- 67 - OTTMER, D.H., BERGEN, W.S., SHLECHTER, N. et BRUINS, P.F.
"Liquid-liquid extraction data" - Ind. Eng. Chem., 1945, 37,
890-894.
- 68 - PAULAIS, R.
"Sur la localisation du nickel dans les organes des mollusques
lamellibranches" - C. r. Ac. Sc., 1936, 203, 685.

- 69 - PEDERSON, C.S., et BREED, R.S.
"The fermentation of glucose by organisms of the genus *Serratia*"
- J. of Bact., 1928, 16, 163-185.
- 70 - PERE, A.
"Mécanisme de la combustion des corps ternaires par un groupe
de microbes aérobies" - Ann. Inst. Pasteur, 1896, 10, 417-448.
- 71 - PEDRIGON, E.
"Semi-microdosage du 2-3 butylèneglycol dans les liquides de
fermentation par oxydation périodique" - Ann. Ferm., 1941, 6,
143-158.
- 72 - PERLMAN, D.
"Production of 2-3 butyleneglycol from wood hydrolyzates" -
Ind. Eng. Chem., 1944, 36, 803.
- 73 - PETERS, R.A.
"Role de l'aneurine dans les processus biochimiques"
Bull. Soc. Chim. Biol., 1946, 28, 700-715.
- 74 - PEYNAUD, E.
"L'acétylméthylcarbinol et le 2-3 butylèneglycol dans les
milieux de fermentation alcoolique" - Rev. ferm. ind. alim.,
1947, 2, 150-158 et 189-196.
- 75 - PIEN, J., BAISSE, J., et MARTIN, R.
"Le dosage du diacétyl dans les beurres (Méthode d'expertise)"
- Le Lait, 1937, 17, 673-698.
- 76 - PREVOT, A.R., et TAFFANEL, J.
"Nouvelles recherches sur la production d'acétylméthylcarbinol
par les bactéries anaérobies" - Rev. Canad. Biol., 1947, 6,
797.
- 77 - PRILL, E.A., et HAMMER, B.W.
"A colorimetric method for the microdetermination of diacetyl"
- Iowa State College, J. of Sc., 1938, 12, 385-395.

- 78 - ROLLET, A.P.
"Sur un nouveau dosage colorimétrique du nickel" - C. r. Ac. Sc., 1926, 183, 212.
- 79 - RIBEREAU-GAYON, J., et PEYNAUD, E.
"Le 2-3 butylèneglycol dans les boissons fermentées" - Bull. Soc. Chim., 1947, 11, 894.
- 80 - SCHMALFUSS, H., et RETHORN, H.
"Bestimmung des Diacetyls" - Z. Unt. Lebensm., 1935, 70, 233-240.
- 81 - SCHMALFUSS, H., et SCHAAKE, H.
"Diacetyl, Methylacetylcarbinol und 2-3 dioxxybutan in menschlichem Harn" - Z. Physiol. Chem., 1931, 200, 169.
- 82 - SENKUS, M.
"Recovery of 2-3 Butanediol produced by fermentation" - Ind. Eng. Chem., 1946, 38, 913-916.
- 83 - SILVERMAN, M., et WERKMAN, C.H.
"The formation of acetylmethylcarbinol from pyruvic acid by a bacterial enzyme preparation" - J. Biol. Chem., 1941, 138, 35-48.
- 84 - STAHLY, G.L. et WERKMAN, C.H.
Iowa State College, J. of Sc., 1936, 10, 205.
- 85 - STAHLY, G.L. et WERKMAN, C.H.
"Origin and relationship of acetylmethylcarbinol to 2-3 butylèneglycol in bacterial fermentations" - Bioch. J., 1942, 36, 575-581.
- 86 - STANIER, R.Y., et ADAMS, G.A.
"The nature of the aeromonas fermentation" - Bioch. J., 1944, 38, 168-171.

- 87 - STARK, W.H., ADAMS, S.L., KOLACHOV, P., et WILLKIE, H.F.
"La production de 2-3 butyleneglycol à partir du grain"
- Rev. ferm. ind. alim., 1948, 3, 7-13.
- 88 - STOTZ, E., et RABORG, J.
"A colorimetric determination of acetoin and diacetyl" -
J. Biol. Chem., 1943, 150, 25-31.
- 89 - STROHMAIER, A.J., et LOVELL, C.L.
"Clarification of acid - hydrolized mash and beer for the
production of 2-3 butanediol from corn" - Ind. Eng. Chem.,
1946, 38, 721-724.
- 90 - TANKO, B., MUNK, L., et ABONYI, I.
"Über die optische Aktivität der durch biochemische Synthese
entstandenen Acetone" - Z. Physiol. Chem., 1940, 264, 91-107.
- 91 - TESTONI, G., et CIUSA, W.
"Dosamento del diacetile nel burro" - Ann. Chim. Applicata,
1931, 21, 147-150.
- 92 - THOMSON, J.
"The chemical action of bacillus oloaceus (Jordan) on glucose
and mannitol" - Proc. Roy. Soc. London, 1912, 84B, 500-504.
- 93 - TOMIYASU, Y.
"Ueber die quantitative Bestimmung von Acetoin".
- Bull. Agric. Chem. Soc. of Japan, 1937, 13, 82.
- 94 - TOMIYASU, Y.
"Ueber die quantitative Bestimmung von 2-3 Butylenglykol"
- Bull. Agric. Chem. Soc. of Japan, 1937, 13, 94.
- 95 - TOMIYASU, Y.
"Weiteres über die Existenz der Carboligase, unter besonderer
Betrachtung der optischen Eigenschaft des Reaktions
produktes" - Bioch. Z., 1937, 292, 234-240.

- 96 - TOMIYASU, Y.
"Untersuchungen über den Abbau von Acetoin durch Microben".
- Bull. Agric. Chem. Soc. of Japan, 1938, 11, 53.
- 97 - TSCHUGAEFF, L.
"Ueber ein neues, empfindliches Reagens auf Nickel".
- Ber., 1905, 38, 2520.
- 98 - VOGES, O. et PROSKAUER, B.
"Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differentialdiagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septikämie" - Z. für Hyg., 1898, 38, 30.
- 99 - WARD, G.E., PETTIJOHN, O.G., et COGUILL, R.D.
"Production of 2-3 butanediol from acid hydrolyzed starch".
- Ind. Eng. Chem., 1945, 37, 1189, 1194.
- 100 - WESTERFELD, W.W.
"A colorimetric determination of blood acetoin".
- J. Biol. Chem., 1945, 161, 495-502.
- 101 - WESTERFELD, W.W. et BERG, R.L.
"Observations on the metabolism of acetoin".
- J. Biol. Chem., 1943, 148, 523-528.
- 102 - WHITE, A.G.C., KRAMPITZ, L.O., et WERKMAN, C.H.
"Method for the direct determination of diacetyl in tissue and bacterial filtrates" - Arch. of Bioch., 1946, 2, 229-234.
- 103 - WILLIAMS, O.B., et MORROW, M.B.
"The bacterial destruction of acetylmethylcarbinol".
- J. of Bact., 1928, 16, 43-48.
- 104 - WILSON, C.E., et LUCAS, H.J.
"Stereochemical relationship of the isomeric 2-3 butanediols and related compounds; evidence of Walden inversion".
- J. Am. Chem. Soc., 1936, 58, 2401.

105 - WILSON, P.W.; PETERSON, W.H. et FRED, E.B.

"The production of acetylmethylcarbinol by clostridium acetobutylicum"

- J. Biol. Chem., 1927, 74, 495-507.

106 - YAMASAKI, I., et KARASIMA, T.

"Studien über die Acyloinkondensation (Acetoinbildung)
des Aceton-Butanol Gärung" - Enzymologia, 1937, 3, 271-280

-:-:-:-

TABIE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : Nouvelles méthodes pour le dosage des composes caractéristiques de la fermentation ...	5
Chapitre I - Fondement de nos nouvelles méthodes.	
1 - Exposé critique des méthodes antérieures	6
2 - Principe de nos nouvelles méthodes	9
Chapitre II - Microdosage de la diméthylglyoxime.	
1 - Principe	13
2 - Mode opératoire	14
3 - Justification du mode opératoire	15
4 - Formation quantitative de diméthylglyoxime nickelique	20
Chapitre III - Microdosage du diacétyl	22
Chapitre IV - Microdosage de l'acétoïne	27
Chapitre V - Microdosage du butanediol	
1 - Principe	31
2 - Mode opératoire	32
3 - Justification du mode opératoire	33
DEUXIEME PARTIE : Exemples d'applications de nos nouvelles méthodes analytiques	38
Chapitre I - L'acétoïne et le butanediol dans les milieux de fermentation alcoolique	39
Chapitre II - Caractérisation du butanediol dans des milieux pauvres en ce composé	43
Chapitre III - Formation d'acétoïne aux dépens de l'acide pyruvique par <u>Bacillus subtilis</u>	47

TROISIEME PARTIE : Destruction du butanediol et de l'acétone par les microbes	55
Chapitre I - Destruction du butanediol et de l'acétoïne par bacillus subtilis	57
1 - Influence de l'aération du milieu	58
2 - Influence du rapport de la concentration du mi- lieu en azote à sa concentration en glucose	64
3.- Conclusions	68
Chapitre II - Destruction du butanediol et de l'acétoïne par bacillus megatherium	70
Conclusions de la Troisième Partie	75
CONCLUSIONS GENERALES	77
Bibliographie	79

-:-:-:-:-

Deuxième thèse

Propositions données par la Faculté

Détermination des masses moléculaires par ultracentrifugation

Vu et approuvé
Paris, le 15 décembre 1948

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Jean CABANNES

Vu
et Permis d'imprimer:

Le Recteur de l'Académie
de Paris.

Le Vice-Président du Conseil de
l'Université
de Paris

A. CHOLLEY

